UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES, TECHNOLOGIES

INSTITUT DE RECHERCHE SUR LA BIOLOGIE DE L'INSECTE

THÈSE présentée par :

Sébastien LEBRETON

soutenue le : **20 octobre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline ou Spécialité : SCIENCES DE LA VIE

STRATEGIES DE PONTE EN SITUATIONS DE COMPETITION CHEZ UNE GUEPE PARASITOÏDE

THÈSE dirigée par :

M. CHEVRIER Claude	Professeur, université François-Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Mme RIVERO Ana	Chargée de Recherche, HDR, CNRS de Montpellier
M. WAJNBERG Eric	Directeur de Recherche, INRA de Sophia-Antipolis

---

JURY :

M. CHEVRIER Claude	Professeur, université François-Rabelais de Tours
M. DARROUZET Eric	Maître de Conférences, université François-Rabelais de Tours
M. LAZZARI Claudio	Professeur, université François-Rabelais de Tours
Mme RIVERO Ana	Chargée de Recherche, HDR, CNRS de Montpellier
M. van ALPHEN Jacques	Professeur, université de Leiden, Pays-Bas
M. WAJNBERG Eric	Directeur de Recherche, INRA de Sophia-Antipolis

A mon grand-père

Remerciements

Au cours de cette thèse, je vais souvent parler d'interactions entre individus en termes de compétition. Pourtant, tout n'est pas que compétition. Il arrive parfois que certains individus s'entraident et allient leurs forces pour atteindre un même but. Cette thèse en est un bon exemple ; sans l'intervention de certaines personnes, rien de tout ceci n'aurait été possible. Je profite donc de ces quelques lignes pour les en remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier Claude Chevrier pour avoir été mon directeur de thèse et pour m'avoir fait confiance dans tout ce que j'ai entrepris au cours de ma thèse. Je tiens également à remercier Eric Darrouzet pour m'avoir co-encadré et toujours soutenu au cours de ces trois dernières années. Je n'oublierai jamais toutes ces conversations au détour d'un couloir à propos de mes résultats et de toutes les perspectives qu'ils ouvraient.

Je voudrais remercier les directeurs successifs de l'IRBI, Jérôme Casas et Jean-Paul Monge pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Merci aussi à Claudio Lazzari pour m'avoir si chaleureusement accueilli lorsque nous avons rejoint son équipe.

Je tiens également à remercier Ana Rivero et Eric Wajnberg qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse et Claudio Lazzari et Jacques van Alphen qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci à tous ceux qui ont directement participé à ce travail. Tout d'abord merci à Eric Imbert et Cindy Menoret pour s'être occupé des élevages de parasitoïdes et de bruches, notamment lors de cette dernière année où il m'était devenu difficile de prendre en charge cette tâche. Merci également à Jean-Philippe Christidès pour m'avoir initié au domaine de l'écologie chimique et m'avoir aidé à comprendre les subtilités de l'analyse factorielle. Un grand merci à Anne-Geneviève Bagnères pour son aide précieuse dans l'identification des hydrocarbures cuticulaires. Enfin, merci à Christophe Bressac, David Giron et Alain Lenoir entre autres pour les quelques discussions scientifiques que nous avons pu avoir ensemble.

Je voudrais également remercier tous les autres doctorants avec qui j'ai partagé mon bureau pendant ma thèse (ou plutôt tous ceux dont j'ai successivement squatté le bureau) : Sandrine, Aurélie, Fabienne et Clément. Merci pour votre amitié, votre soutient et la bonne humeur qui a toujours régné au sein de ces bureaux. Une mention spéciale pour Clément et sa maîtrise sans faille de la langue de Shakespeare, merci pour ton aide quand mes connaissances en anglais me faisaient défaut.

Encore merci à Sandrine, Fabienne et Clément, ainsi qu'à Jérémy et Thomas pour la bonne ambiance qui a toujours accompagnée nos repas le midi. Merci également à Jérémy, Denis, Fabrice, Sylvain, Franck, Nathan ainsi qu'aux collègues de Physique, Chimie et d'ailleurs pour les matches de foot qui ont rythmés nos étés. Enfin, merci à l'ensemble du personnel de l'IRBI, aux doctorants et post-docs et à l'ensemble des stagiaires pour leur accueil, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Je tiens également tout particulièrement à remercier ma famille et mes amis qui ont toujours été là pour moi. Je remercie mes parents et mes grands-parents qui m'ont toujours soutenu et qui ont toujours cru en moi, tout au long de mes études même si, j'en suis certain, ils se sentaient parfois dépassés. Sans vous, je ne serrais certainement pas là où j'en suis aujourd'hui.

Pour finir, merci à toi, Julie, pour m'avoir supporté ces trois dernières années. Merci d'avoir toujours été derrière moi, à me pousser, me rassurer et m'aider à reprendre confiance en moi dans les moments les plus difficiles. Pour tout cela et bien plus encore, merci.

Résumé

Les insectes parasitoïdes effectuent leur développement aux dépens d'un autre organisme, un hôte. La qualité des hôtes va directement influencer le développement et la survie des parasitoïdes. Le nombre de descendants produits par les femelles dépend donc de leur capacité à localiser les hôtes et à déterminer leur qualité. Aussi, lorsqu'elles sont en situation de compétition et que les hôtes en question se trouvent être en quantité limitée, elles devront adapter leurs stratégies de ponte de manière à maximiser leur succès reproducteur. L'objectif de cette thèse est d'étudier les stratégies de ponte des femelles d'une espèce de parasitoïde solitaire, *Anisopteromalus calandrae* en situation de compétition intraspécifique. Chez les espèces solitaires, en partie à cause de combats larvaires mortels, un seul adulte pourra émerger d'un hôte donné, et ce, quel que soit le nombre d'œufs initialement pondus. Nous nous sommes intéressés à ces combats en étudiant les facteurs biotiques pouvant affecter leur issue. Chez cette espèce, les larves femelles sont de meilleures compétitrices que ne le sont les mâles. Plus l'intervalle de temps entre deux pontes augmente, plus le deuxième individu pondu risque de se faire éliminer. Ainsi, chez cette espèce, les femelles sont capables de distinguer les différentes catégories d'hôtes auxquelles elles sont confrontées. Premièrement, le choix entre hôtes parasités et non parasités dépend de la stratégie de la femelle, à savoir si elle les utilise pour la ponte ou pour se nourrir. Cette stratégie est elle-même modulée par son état physiologique (âge, réserves nutritives…). Deuxièmement, lorsque les femelles sont confrontées à des hôtes déjà parasités, elles pondent préférentiellement sur ceux récemment parasités, hôtes sur lesquels leurs descendants ont la plus grande probabilité de survivre. L'origine de cette discrimination est dûe à l'évolution du profil cuticulaire de l'hôte au cours du temps après parasitisme. De plus, lorsque les œufs présents sur les hôtes parasités ont atteint un certain stade de développement, les femelles sont capables de reconnaitre leur sexe. Elles vont ainsi avoir tendance à pondre plus de mâles lorsque des œufs femelles sont déjà pondus. Toutefois, elles évitent de les pondre directement sur des hôtes déjà parasités par un œuf femelle, les mâles ayant peu de chances de remporter le combat. L'aspect adaptatif de ces stratégies ainsi que les mécanismes sous-jacents sont discutés.

Mots-clés : *Anisopteromalus calandrae*, Capacités de discrimination, Combats larvaires, Compromis évolutif, Fitness, Kairomones, Parasitoïdes solitaires, Stratégies de ponte, Tubes alimentaires

Abstract

Insect parasitoids develop at the expense of other organisms called hosts. Host quality is thus important for parasitoid development and survival. The number of offspring a parasitoid female produce thus depend on her capacity to localize hosts and to determine their qualities. In competition, when hosts become scarce, they are expected to adjust their oviposition strategies in order to maximize their fitness. The main goal of this work is to study the oviposition strategies of a solitary parasitoid, *Anisopteromalus calandrae*, under intraspecific competition conditions. In solitary species, partly because of lethal larval fights, only one adult can emerged from a given host, whatever the number of eggs initially laid on it. We were thus interested in larval fights by investigating biotic factors affecting their outcomes. Our results show that, in this species, females are better competitors in larval fights. Moreover, the latter the second individual is laid after the first, the more the probability he would be eliminated will be high. Consequently, parasitoid females are able to discriminate the different categories of hosts they are confronted to. Firstly, the choice between parasitized and unparasitized hosts depends on the strategy they employed toward them, that is whether the host is used for oviposition or directly to feed on. Moreover, these strategies are directly linked to the females' physiological state (age, nutritive reserve…). Secondly, when females are confronted to already parasitized hosts, they preferentially select those recently parasitized, i.e., on which their offsprings have the better probability to win the competition. This discrimination is based on modifications of the host's cuticular profile with time after parasitism. Moreover, when eggs present on hosts have reached a certain development stage, females are able to assess their sex. They thus have a tendency to lay more male eggs when female eggs are already laid in the vicinity. Nevertheless, they avoid laying them directly on hosts parasitized by a female egg, because males would have few probabilities to win the competition. Adaptive aspects of these strategies and mechanisms involved are discussed.

Key-words: *Anisopteromalus calandrae*, Discrimination capacities, Fitness, Host-feeding, Kairomones, Larval fights, Oviposition strategies, Solitary parasitoids, Trade-off

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 5
Abstract 6
Table des matières 7
Liste des tableaux 11
Liste des figures 12

- INTRODUCTION GENERALE - 17
Stratégies comportementales et fitness 18
Interactions entre individus : notion de compétition 23
Compétition par exploitation 23
Compétition par interférence 24
La compétition chez les parasitoïdes 25
Localisation et discrimination de l'hôte : importance des signaux chimiques 32
Objectifs de la thèse 36

- PREMIERE PARTIE - Présentation du système étudié et outils expérimentaux utilisés 40
Le système tritrophique 41
La plante hôte Vigna unguiculata 41
L'insecte phytophage Callosobruchus maculatus 41
Le parasitoïde Anisopteromalus calandrae 42
Les outils expérimentaux 44
Le marqueur phénotypique 44
Le système de graines artificielles 45

- DEUXIEME PARTIE - Compromis entre reproduction immédiate et reproduction future dans un contexte de compétition 47
Contexte de l'étude 48

Article 1 Could hosts considered as low quality for egg-laying be considered as high quality for host-feeding? 49

Introduction 50
Materials and methods 52
Rearing conditions 52
General methods 52
Preparation of experimental females 53
Impact of age and diet on reproductive strategies and host selection 53
Impact of age and diet on egg maturation and resorption 54
Analysis of the haemolymph of parasitized and unparasitized hosts 54
Statistical analysis 55
Results 55
Impact of age and diet on reproductive strategies and host selection 55
Impact of age and diet on egg maturation and resorption 57
Analyses of the haemolymph of parasitized and unparasitized hosts 58
Discussion 58
Acknowledgments 61
Conclusion de la partie 62

- TROISIEME PARTIE - Impact des combats larvaires sur les stratégies de ponte des femelles 64
Contexte de l'étude 65

Article 2 Discrimination of the age of conspecific eggs by an ovipositing ectoparasitic wasp 67
Abstract 68
Introduction 68
Materials and methods 70
Rearing conditions 70
General methods 71
Host discrimination capacity of an ovipositing female 71
Survival of supernumerary eggs 72
Discrimination of the age of eggs 72
Statistical analysis 73
Results 73
Host discrimination capacity 73
Survival of supernumerary eggs 74

Discrimination of the age of eggs 75
Discussion 76
Acknowledgements 78

Article 3 Modifications of the chemical profile of hosts after parasitism allow parasitoid females to assess the time elapsed since the first attack 79
Abstract 80
Introduction 80
Materials and Methods 82
Insects Rearing 82
Behavioural analyses 82
Chemical Analysis of hosts' cuticular profile 83
Bioassays with hosts chemical extracts 84
Results 84
Behavioural Analysis 84
Chemical Analysis of hosts' cuticular profile 85
Bioassays with hosts chemical extracts 88
Discussion 88

Article 4 Sex allocation strategies in response to conspecifics offspring sex ratio in solitary parasitoids 92
Abstract 93
Introduction 93
Materials and Methods 95
Rearing conditions 95
Sex competition in larval combat 95
Egg sex discrimination 97
Statistical analyses 98
Results 98
Sex competition in larval combat 98
Egg sex discrimination 99
Discussion 101
Acknowledgements 104
Conclusion de la partie 105

- DISCUSSION GENERALE - 107
En quoi un hôte parasité est-il plus avantageux pour s'alimenter ? 110
Quels sont les stimuli responsables de la perception de la qualité de l'hôte ? 114
Comment les asymétries dans les combats larvaires influencent-elles les stratégies de ponte des femelles ? 118
Conclusion et perspectives 123

- BIBLIOGRAPHIE - 125

Liste des tableaux

Table 1 Behavioural and oviposition strategies of *Anisopteromalus calandrae* females confronted with *Callosobruchus maculatus* hosts parasitized once, at 2 or 28 h previously. Number of host larva types visited first, selected, and oviposited upon by the female wasps. 76

Table 2 Cuticular hydrocarbons present on the host's cuticule with their relative amount on each category of host 87

Table 3 Estimation of the number of R males emerging in each category of larval fight. 97

Liste des figures

Figure 1 Théorie du fourragement optimal. Le temps optimal d'exploitation d'un patch dépend de la durée de trajet entre ce même patch et un patch voisin. Un temps de trajet long (rouge) induit de rester plus longtemps dans le patch que pour un trajet court (vert). D'après Stephens & Krebs (1986). 22

Figure 2 La distribution libre idéale. Il n'y a pas de limite au nombre de compétiteurs exploitant une ressource. Chaque individu est libre d'aller où il veut. Les premiers vont vers le patch le plus riche. Avec l'augmentation de la compétition, la disponibilité de la ressource du patch riche diminue jusqu'au point *a*, où elle devient équivalente à celle du patch pauvre. D'après Krebs & Davies (1993). 24

Figure 3 Larve de l'ectoparasitoïde *Anisopteromalus calandrae* s'attaquant à un œuf conspécifique à la surface de son hôte (*Callosobruchus maculatus*). 26

Figure 4 Sex-ratio de ponte (proportion de mâles) optimal prédit par la théorie de la Local Mate Competition pour des espèces haplodiploïdes. D'après Godfray (1994)..... 31

Figure 5 Sex-ratios optimaux prédits par le modèle du *Sex Ratio Games*. La ligne bleue représente le sex-ratio conférant à la deuxième femelle la plus grande fitness. La ligne rouge représente quant à elle le sex-ratio conférant à la deuxième femelle une fitness supérieur à la première. 32

Figure 6 Schéma récapitulatif des questions abordées lors de la thèse. Nous étudierons les capacités de discrimination des femelles *A. calandrae* lorsqu'elles sont confrontées à différents types d'hôtes. Nous verrons ainsi comment ces capacités ainsi que la probabilité de survie de leurs descendants affectent leur cycle de ponte au niveau du choix de l'hôte et directement au niveau de la ponte (essentiellement en termes de sex-ratio). Nous verrons également comment les stratégies adoptées par les femelles (choix de l'hôte, ponte et alimentation) dépendent de leur état physiologique. 38

Figure 7 Plants (à gauche) et graines (à droite) de Niébé *Vigna unguiculata*. 41

Figure 8 *Callosobruchus maculatus* femelle (à gauche) et mâle (à droite) dans un stock de graines de Niébé. 42

Figure 9 Femelles *Anisopteromalus calandrae* pondant sur une graine de Niébé contenant des larves de bruches *Callosobruchus maculatus.* 43

Figure 10 Cycle de reproduction du parasitoïde *Anisopteromalus calandrae*. Après l'accouplement la femelle cherche un hôte (larve de bruche) afin d'y pondre un œuf.

Suite à l'éclosion, la larve issue de cet œuf se développe aux dépens de l'hôte en se nourrissant de ses tissus jusqu'à l'émergence de l'adulte. 44

Figure 11 Les deux lignées d'*Anisopteromalus calandrae* présentes au laboratoire : la lignée sauvage aux yeux noirs (à gauche) et la lignée mutante aux yeux rouges (à droite). 45

Figure 12 Femelle *A. calandrae* pondant sur une graine artificielle dans laquelle a été placée une larve de bruche *C. maculatus*. 45

Figure 13 Activity and strategy of females during the choice test. (A) Percentage of active females during the test (females who selected a host for feeding and/or egg-laying) in each category: 3-day-old females with (3d-fed) or without (3d) access to hosts before the test, and 15-day-old females with (15d-fed) or without (15d) access to hosts. (B) Reproductive strategies of active females (oviposition in white, host-feeding in black, or both in grey) on each category of host (parasitized: P, or unparasitized: UnP) for each category of females. Statistical tests (χ^2-test) compare the global distribution of the three possible strategies on parasitized and unparasitized hosts between female categories. Statistical differences between female categories are shown by different letters (a, b, c). (C) Percentage of active females which performed oviposition only or host-feeding only on unparasitized (light grey) or parasitized (dark grey) hosts irrespective of their physiological state. ** P<0.01 (χ^2-test). 56

Figure 14 Number of mature eggs (mean ± SE) carried by 3-day-old and 15-day-old females with both diet treatments before the choice test. Statistical differences (Mann-Whitney U-test) are shown by different letters (a, b, c). 57

Figure 15 Amount of sugars, proteins and lipids (mean ± SE) in haemolymph of unparasitized (◯) and 2-hour-parasitized hosts (■). ** P<0.01 (Student *t*-tests). 58

Figure 16 Mean (± SE) number of *Callosobruchus maculatus* hosts attacked and eggs laid by mated *Anisopteromalus calandrae* females per patch (n = 11) when ovipositing on unparasitized (UnP) or previously parasitized (P) hosts. ** P<0.01. 74

Figure 17 Relationship between the proportion of surviving *Anisopteromalus calandrae* eggs deposited under superparasitism conditions and the time elapsed since the first egg was laid. Proportion of surviving eggs observed (diamond) and linear regression (solid line). No differences were found between the two strains. 75

Figure 18 Proportion of females selecting each category of artificial seeds to lay their eggs (2h or 28h parasitized) when confronted to each category of tests: the whole parasitized system (control), parasitized capsules with an unparasitized host (test 1), eggs on an unparasitized host into a clean capsule (test 2) and parasitized hosts on which eggs were

previously removed, in a clean capsule (test 3). Marks show significant differences between proportions observed and a random distribution of 50:50. * p<0.05; ** p<0.01. 85

Figure 19 Gas chromatogram of the cuticular pentane extract of hosts parasitized for 2h (A) or 28h (B). IS= internal standard. 86

Figure 20 Discriminant analysis based on the relative amount of the 30 major peaks of the cuticular profile of the different categories of hosts (L4 larvae parasitized for 2h or 28h, unparasitized L4 larvae stored in the same conditions than 2h and 28h parasitized hosts, and unparasitized pre-pupae). 89

Figure 21 Percentage of larvae of each sex emerging after a fight in a two-larvae contest. Both male/male and female/male competition were investigated with either individuals laid at the same time or with a 28 hours time interval. The outcomes of male/male fights were observed directly, while those of female/male fights had to be estimated (for more details, refer to the method section). With regard to eggs laid at the same time, first and second eggs were chosen arbitrarily. 99

Figure 22 Adjustment of the females' offspring sex ratio according to both sex and the developmental stage of the eggs of a previous clutch. Proportions of male and female eggs laid on previously parasitized hosts obtained in a male/female choice test with 2-hour-old (just after oviposition) or 28-hour-old (about to hatch) eggs, or a male/male choice test (in male/male choice tests, as results are similar whatever the developmental stage of first eggs (Fisher test, p=1.0), results with 2-hour-old and 28-hour-old eggs have been pooled). Marks show a statistical difference between the sex ratio of eggs laid on hosts previously parasitized by a male egg and by a female egg (*** p<0.001). The values in each bar represent the number of tested females oviposited on each category of host. 100

Figure 23 Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de la thèse (modifié d'après Vinson, 1998). Les stratégies de pontes des femelles *A. calandrae* dépendent à la fois de facteurs environnementaux comme la qualité des hôtes (en bleu) ainsi que de facteurs internes tels que leur état physiologique (en rouge). Les femelles perçoivent à distance le statut parasité de l'hôte ainsi que le temps écoulé depuis la première ponte lorsque celui-ci est parasité. Lorsqu'elle est en contact antennaire avec la graine, elle peut distinguer le sexe de l'œuf présent sur l'hôte parasité à l'intérieur de la graine, lui permettant d'adapter son sex-ratio de ponte en conséquence. Quant à l'état physiologique de la

femelle (âge, réserves nutritives), il influence à la fois le choix de l'hôte ainsi que la stratégie employée aux dépens de celui-ci (alimentation et/ou ponte)..... 109
Figure 24 Modèle proposé pour le gain énergétique global perçu lors de l'alimentation sur un hôte. Le gain perçu aux dépens d'un hôte parasité diminue au cours du temps après le parasitisme (courbe rouge). Le gain perçu sur un hôte non parasité, quant à lui, reste stable pour un hôte de même stade larvaire (courbe bleue). Dans la période qui suis le parasitisme, il est avantageux pour un parasitoïde de se nourrir sur un hôte parasité. Après un temps t, les deux types d'hôtes représentent la même valeur en termes d'énergie disponible. Lorsque le temps écoulé depuis le premier parasitisme est supérieur à t, il devient avantageux de se nourrir aux dépens d'un hôte non parasité de même stade larvaire que l'hôte parasité au moment du parasitisme. 112

“Il n’est pas d’un homme raisonnable de blâmer par caprice l’étude des insectes, ni de s’en dégoûter par la considération des peines qu’elle donne. La nature ne renferme rien de bas. Tout y est sublime, tout y est digne d’admiration.”

Aristote

- INTRODUCTION GENERALE -

Tout organisme doit, à chaque instant, adapter son comportement en fonction de la situation à laquelle il est confronté. Bien souvent, les stratégies comportementales adoptées par les individus ont un impact plus ou moins important sur leurs capacités à engendrer des descendants. Les insectes parasitoïdes se reproduisent en pondant leurs œufs sur d'autres insectes appelés hôtes. Ces hôtes représentent alors la seule ressource nutritive disponible pour le développement de la larve (Godfray, 1994). La qualité de l'hôte influence donc directement le succès de développement de la larve parasitoïde. Si un individu est pondu sur un hôte de qualité insuffisante, sa survie ne pourra pas être assurée, ou bien son développement s'en trouvera affecté, réduisant ainsi la valeur sélective (ou « fitness » en anglais) de l'adulte qui l'a pondu. La fitness des femelles parasitoïdes dépend donc de leurs capacités à pouvoir localiser précisément et rapidement des hôtes de bonne qualité. Ceci est d'autant plus important lorsqu'elles sont en situation de compétition et que les hôtes se trouvent en quantité limitée. En effet, même si une femelle parasitoïde peut pondre ses descendants sur des hôtes préalablement parasités par des compétitrices, la compétition qui va s'instaurer entre ses propres descendants et ceux d'autres femelles sera préjudiciable au bon développement des larves (Godfray, 1994). Les femelles parasitoïdes sont donc soumises à de fortes pressions de sélection, les contraignant, lorsqu'elles sont en situation de compétition, à adopter les stratégies comportementales leur conférant la meilleure fitness. Après avoir introduit les concepts généraux de stratégie comportementale, fitness et compétition, nous nous focaliserons sur la compétition chez les parasitoïdes ainsi que sur les stratégies comportementales développées par les femelles pour faire face à cette contrainte. Nous détaillerons également les différents signaux que les femelles parasitoïdes perçoivent pour localiser et discriminer des hôtes de différentes qualités.

Stratégies comportementales et fitness

Une **stratégie comportementale** se définit comme un acte ou une séquence d'actes exécutée par un animal dans une situation donnée (Harvey, 1994). La **fitness** d'un individu (ou plus précisément d'un génotype), quant à elle, traduit sa capacité à se reproduire. Elle va dépendre de deux facteurs : la probabilité de survie de l'organisme entre le stade zygote et le stade adulte et son succès reproducteur, c'est-à-dire le nombre de descendants engendrés par celui-ci (Harvey, 1994). Une stratégie comportementale influençant l'un ou l'autre de ces deux facteurs de manière positive aura pour conséquence une plus grande dispersion des gènes des individus adoptant cette stratégie aux générations futures. Cette stratégie conférant un avantage sélectif aux individus sera de plus en plus représentée au sein de la population et

sera par conséquent sélectionnée au cours de l'évolution, aux dépens des autres stratégies. Ceci est vrai pour les stratégies comportementales comme pour tout autre trait phénotypique influençant la fitness.

L'exemple de la phalène du bouleau (*Biston betularia*) en Angleterre illustre bien ce concept. Chez cette espèce, il existe deux morphes : un morphe de couleur claire (*insularia*, blanc taché de noir) et un morphe de couleur plus foncée (*carbonaria*, presque entièrement noir). Vers la fin du 19ème siècle, le morphe *carbonaria* est devenu majoritaire dans les régions industrialisées de Grande-Bretagne, représentant plus de 90% de l'espèce. A partir des années 1950, le phénomène a commencé à s'inverser, avec de plus en plus une proportion importante d'*insularia* dans la population (Cook, 2000). Ce phénomène peut être relié à la présence de pollution d'origine industrielle. Au moment de l'industrialisation de la région, des dépôts de résidus de la combustion du charbon ont assombri l'écorce des bouleaux. Le morphe *carbonaria*, de couleur plus sombre, possédait alors un avantage adaptatif sur *insularia* qui lui, était moins bien camouflé dans son environnement et donc plus aisément repéré par des prédateurs. Lors de la deuxième moitié du 20ème siècle, avec la volonté de réduire la pollution, les arbres ont retrouvé leurs couleurs d'origine. Le morphe *insularia* étant mieux adapté à ce nouvel environnement, sa fréquence a de nouveau augmentée dans la population (Cook et al., 1986). Cet exemple illustre bien le fait qu'un phénotype considéré seul ne peut en rien prédire la conséquence qu'il pourra avoir sur la fitness, cela dépend de l'environnement dans lequel il s'exprime. C'est pourquoi, notamment dans des environnements changeants, il peut y avoir différentes stratégies employées par des individus d'une même population sans pour autant que l'une puisse être considérée comme plus adaptée qu'une autre. Tout dépend du contexte dans laquelle elle est employée.

De la même façon, différentes stratégies peuvent s'exprimer dans une population en fonction du statut et de l'état physiologique de l'individu (âge, taille, réserves énergétiques, statut social…). C'est le cas par exemple en ce qui concerne l'accouplement de la libellule *Calopteryx maculata*. Chez cette espèce, les mâles peuvent adopter deux stratégies différentes. Certains possèdent un territoire qu'ils défendent. D'autres restent aux frontières de ces territoires dans l'attente qu'une femelle passe à proximité afin de s'accoupler avec (Forsyth & Montgomerie, 1987). Les mâles appartenant à cette deuxième catégorie sont en général d'anciens mâles territoriaux. Cette stratégie dite conditionnelle dépend ainsi à la fois de l'âge du mâle mais également de la densité de la population. Lorsque la compétition devient plus intense, les mâles les plus vieux, qui ne peuvent plus défendre leur territoire,

adoptent cette stratégie alternative afin de prolonger leurs vies reproductives (Forsyth & Montgomerie, 1987).

La fitness traduit les capacités d'un individu à se reproduire, donc plus généralement à transmettre ses gènes et selon la théorie du gène égoïste de Dawkins (1976), la sélection naturelle s'applique à l'échelle du gène, l'organisme n'étant qu'un « véhicule » permettant aux gènes de se disperser. Or, un organisme transmet ses gènes non seulement par sa propre reproduction, mais également par la reproduction des individus qui lui sont génétiquement apparentés. Il s'agit là du concept d' « **inclusive fitness** » (Hamilton, 1964; West et al., 2007b), particulièrement important chez les insectes sociaux, où tous les individus d'une même colonie sont apparentés (Oster & Wilson, 1979; Boomsma & Franks, 2006). Même chez les espèces non sociales il pourra être important de favoriser la fitness d'individus apparentés (West et al., 2007a), tout du moins en ce qui concerne les descendants. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'une des composantes de la fitness correspond à la probabilité de survie jusqu'au stade adulte. Il est donc important pour un individu que ses descendants survivent jusqu'à ce qu'ils soient en âge de se reproduire à leur tour. Différentes stratégies ont ainsi pu se mettre en place dans le règne animal, allant du choix du site de ponte aux soins apportés aux jeunes.

Lorsqu'on étudie les stratégies comportementales, on se focalise souvent sur un type de comportement. Cependant, en milieu naturel, un animal doit généralement faire face à des contraintes différentes en même temps. Il arrive parfois que ces contraintes exigent des adaptations comportementales opposées pour adopter des stratégies optimales. On parle alors de **compromis évolutif** (ou **trade-off** en anglais). L'individu doit par conséquent ajuster de manière adaptative les valeurs de différents traits ou caractères qui ne peuvent pas être optimisés simultanément en réponse aux différentes contraintes (Danchin et al., 2005). Pour illustrer ce concept, prenons l'exemple du compromis entre alimentation et évitement des prédateurs. Lorsqu'ils explorent leur environnement à la recherche de nourriture, les animaux sont plus exposés à la prédation que lorsqu'ils sont dans un refuge par exemple. L'augmentation du risque de prédation peut également être liée à une baisse de vigilance due au comportement exploratoire. Ils se trouvent donc confrontés à un compromis entre s'alimenter et être confrontés à un risque de prédation ou bien rester vigilant aux prédateurs mais ne pas rechercher de nourriture. La décision pourra alors être modulée à la fois par des facteurs environnementaux comme le risque de prédation (présence ou non de prédateurs, nombre de prédateurs…) et des facteurs endogènes comme le stock de réserves nutritives. La larve de l'Ephéméroptère *Baetis tricaudatus* qui vit en milieu aquatique, reste par exemple

moins longtemps en surface en présence de son prédateur (chabot tacheté, *Cottus bairdii*) mais accepte un plus fort risque de prédation lorsque la nourriture est abondante ou lorsqu'elle a été préalablement privée de nourriture (Kohler & McPeek, 1989). Par opposition, les larves de *Glossosoma nigrior* ne répondent pas à la présence de ce prédateur, mais adaptent leur comportement en fonction de la disponibilité en nourriture et de leur propre niveau de satiété (Kohler & McPeek, 1989). De la même manière, on peut avoir un compromis entre survie et reproduction. Chez certains insectes les femelles s'orientent préférentiellement vers les mâles en fonction de leur chant (Snedden & Greenfield, 1998). Le succès reproducteur des mâles dépend donc des caractéristiques de leur chant (amplitude, taux de pulses…) (Greig & Greenfield, 2004). Cependant, les prédateurs (Greenfield & Baker, 2003) et parasitoïdes (Lehman & Heller, 1998) qui s'attaquent à eux les localisent généralement grâce à ces signaux acoustiques. Les mâles de ces espèces doivent donc moduler leur chant en fonction du risque de prédation et de leur probabilité de s'accoupler.

L'écologie comportementale vise à comprendre comment les comportements contribuent à la survie et à la reproduction des organismes d'un point de vue écologique (Krebs & Davies, 1993). Plus précisément, l'écologiste comportemental cherche à comprendre comment une stratégie comportementale utilisée par une espèce a pu être conservée au cours de l'évolution, en d'autres termes, comment cette stratégie permet aux individus de cette espèce de maximiser leur fitness. Pour répondre à cette question, il est possible d'évaluer soit directement l'impact de la stratégie observée sur la fitness de l'organisme en termes de succès reproducteur ou de survie, soit de quantifier les coûts et bénéfices relatifs à l'utilisation de cette stratégie. Une stratégie comportementale pourra être considérée comme optimale lorsqu'elle maximise les bénéfices à moindre coût. Une autre approche, plus théorique cette fois, consiste à déterminer mathématiquement comment, dans une situation donnée et sous certaines contraintes, un animal devrait se comporter pour maximiser sa fitness (voir planche 1). De nombreuses théories reposant sur des **modèles mathématiques** ont ainsi pu voir le jour (Hamilton, 1967; Charnov, 1976a; Parker & Stuart, 1976; Mangel & Clark, 1988). La plupart de ces modèles ont ensuite pu être testés (et souvent validés) expérimentalement. L'écologie comportementale essaie de répondre plus précisément aux questions : *Pourquoi un organisme adopte-t-il tel comportement ? Quelle est la fonction de ce comportement ?* Une autre approche consiste à s'intéresser aux causes proximales des comportements en étudiant le comportement d'un point de vue mécanistique, à travers les facteurs environnementaux et endogènes à l'origine du comportement. Cette approche revient à répondre aux questions suivantes : *Comment ce comportement a-t-il pu être déclenché ?*

Quels facteurs sont à l'origine de ce déclenchement ? Ces deux approches complémentaires permettent d'avoir une vision globale d'un comportement en répondant à la fois au *pourquoi* et au *comment* (Krebs & Davies, 1997).

Planche 1 - Un exemple de modèle utilisé pour prédire l'optimalité d'une stratégie : la Théorie du Fourragement Optimal

La Théorie du Fourragement Optimal (Optimal Foraging Theory) développée par Charnov (1976a) et reprise par Stephens et Krebs (1986) prédit la durée optimale d'exploitation d'une ressource. Imaginons un environnement dans lequel la ressource (de la nourriture par exemple) est disposée en patchs. Le trajet entre les différents patchs est coûteux à la fois en temps et en énergie. Lorsqu'un individu arrive dans un patch de nourriture, il va commencer à consommer cette nourriture, et au fur et à mesure qu'il la consomme, la ressource va s'épuiser. Après un certain temps d'exploitation, il pourra ainsi être avantageux de quitter le patch pour un patch voisin qui disposera d'une plus grande quantité de nourriture. La Théorie du Fourragement Optimal permet de prédire à partir de quel moment il est intéressant de changer de patch et montre que celui-ci dépend non seulement de la qualité du patch mais également de la durée de trajet pour rejoindre un patch voisin (**Figure 1**).

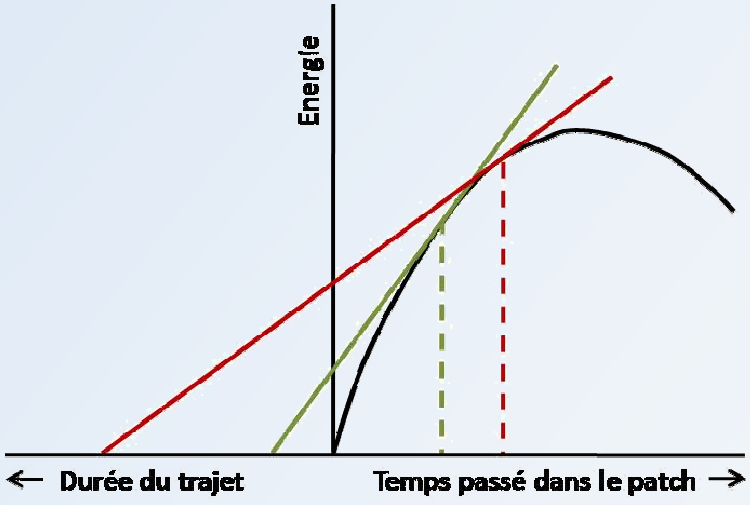

Figure 1 Théorie du fourragement optimal. Le temps optimal d'exploitation d'un patch dépend de la durée de trajet entre ce même patch et un patch voisin. Un temps de trajet long (rouge) induit de rester plus longtemps dans le patch que pour un trajet court (vert). D'après Stephens & Krebs (1986).

Interactions entre individus : notion de compétition

La Théorie du Fourragement Optimal (voir planche 1), tout comme d'autres modèles, prédit la stratégie optimale d'exploitation d'une ressource par un individu seul dans son environnement. Or, dès lors que plusieurs individus exploitent la même ressource et que celle-ci se trouve être en quantité limitée, ils entrent en **compétition**. Ainsi, la stratégie optimale employée par un individu pourra dépendre des stratégies employées par les autres individus (Maynard Smith, 1974).

La compétition peut apparaître aussi bien entre individus de la même espèce qu'entre individus d'espèces différentes. Lorsque les individus appartiennent à la même espèce, on parle de compétition intraspécifique. C'est notamment le cas lorsque plusieurs mâles (les compétiteurs) s'affrontent pour l'accès à une femelle (la ressource). Lorsque les compétiteurs appartiennent à deux espèces différentes, il s'agit alors de compétition interspécifique. C'est par exemple le cas de deux espèces de prédateurs s'attaquant à la même proie.

Compétition par exploitation

La compétition peut s'exprimer de différentes manières. La première catégorie de compétition, la plus simple, se produit lorsque les individus n'interagissent pas directement entre eux. Chaque individu diminue la quantité de ressources disponibles pour les autres du simple fait de son exploitation. Il s'agit de la **compétition par exploitation** (Krebs & Davies, 1993). Plus le nombre de compétiteurs augmente, et plus la quantité de ressources disponibles pour chaque individu diminue. Prenons l'exemple d'un environnement composé de deux patchs[1] de nourriture. Imaginons que ces deux patchs diffèrent dans leur qualité, soit en termes de quantité, soit en termes de composition de la ressource (**Figure 2**). Dans ce cas, les premiers individus choisiront d'exploiter le patch le plus riche, c'est-à-dire celui qui apportera à chacun, soit la plus grande quantité de nourriture, soit la nourriture de meilleure qualité. Mais plus le nombre de compétiteurs augmente et plus la part de ressource que chacun pourra obtenir du patch riche diminuera jusqu'à devenir équivalente à ce qui est disponible dans le patch le plus pauvre (dans lequel il n'y a pour l'instant aucun individu) (**Figure 2**). A ce moment là, il pourra être profitable pour de nouveaux individus arrivant dans l'environnement de commencer à exploiter ce dernier patch. C'est la **théorie de la distribution libre idéale** (Fretwell, 1972). Ce phénomène est également connu sous le terme d'effet tampon : alors

[1] Un patch se définit ici comme un ensemble de ressources isolé dans l'espace des autres ressources disponibles dans l'environnement.

qu'à de faibles densités de population les individus ont tendance à choisir préférentiellement les patchs les meilleurs, à de fortes densités, une plus grande fraction de la population se retrouve dans les patchs les plus pauvres (Sutherland, 1996).

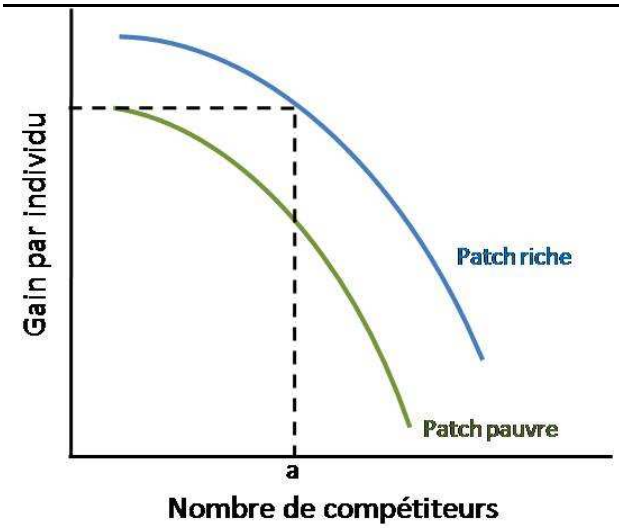

Figure 2 La distribution libre idéale. Il n'y a pas de limite au nombre de compétiteurs exploitant une ressource. Chaque individu est libre d'aller où il veut. Les premiers vont vers le patch le plus riche. Avec l'augmentation de la compétition, la disponibilité de la ressource du patch riche diminue jusqu'au point *a*, où elle devient équivalente à celle du patch pauvre. D'après Krebs & Davies (1993).

La compétition par exploitation peut également avoir lieu lorsque l'exploitation des ressources se produit de manière asynchrone. Dans ce cas aussi, il n'y a pas d'interaction directe entre les compétiteurs, ceux-ci n'étant pas présents simultanément dans un même patch. Le premier individu va ainsi réduire la quantité de ressource disponible pour les autres individus qui exploreront le patch par la suite.

Compétition par interférence

L'exemple précédent suppose que les différents compétiteurs n'interagissent pas directement entre eux pour l'accès à une ressource. Or, dans la nature, il arrive souvent que les animaux interfèrent dans l'exploitation de la ressource de leurs compétiteurs. On parle alors de **compétition par interférence** (Sutherland, 1996). La compétition par interférence vient s'ajouter à la compétition par exploitation. C'est le cas des individus qui défendent la ressource qu'ils sont parvenus à obtenir. Reprenons l'exemple précédent : deux patchs de qualités différentes. Le premier individu choisit le patch de meilleure qualité. Imaginons maintenant que contrairement au modèle de la distribution libre idéale, cet individu ne tolère la présence que d'un nombre limité de compétiteurs. Dans un premier temps, il va réduire la quantité de ressources disponibles par déplétion, ce qui revient à de la compétition par exploitation. Ensuite, lorsque le nombre maximal de compétiteurs présents sur le patch est atteint, ceux-ci vont chasser les individus suivants. Ces derniers seront obligés de se rabattre

sur le patch de moindre qualité, et ceci jusqu'à ce que le quota de compétiteurs tolérés sur ce patch soit atteint (Krebs & Davies, 1993).

Il arrive parfois que les différents individus n'aient pas les mêmes aptitudes à la compétition. Il se crée alors une **asymétrie** dans la compétition et un individu peut avoir un avantage sur un autre (Harvey, 1994). Cette asymétrie peut avoir un impact uniquement sur la déplétion de la ressource : un individu qui aurait une consommation deux fois plus rapide que son compétiteur aurait un avantage sur lui (Krebs & Davies, 1993). Mais elle peut également avoir des conséquences sur les interactions directes entre les individus. L'exemple le plus évident est le cas d'une compétition qui induits des combats physiques et dans laquelle les deux compétiteurs ne sont pas de même taille. Le compétiteur le plus gros aura généralement un avantage sur le plus petit. D'autres asymétries peuvent également s'avérer importante dans l'issue d'une compétition comme le statut propriétaire/intrus des compétiteurs (Maynard Smith, 1982). En effet, la valeur donnée à une ressource par le propriétaire est souvent plus importante que celle donnée par un intrus qui chercherait à se l'approprier. L'énergie investie par le propriétaire pour défendre cette ressource est alors généralement plus importante que celle investie par l'intrus pour l'obtenir (Petersen & Hardy, 1996).

La compétition chez les parasitoïdes

Chez les parasitoïdes, la compétition peut ainsi apparaître à différents niveaux : dès le stade larvaire ou bien au stade adulte.

Pour les larves de parasitoïdes, l'hôte représente la seule source de nourriture disponible pour leur développement. Lorsque plusieurs larves exploitent le même hôte, celles-ci sont donc en compétition pour l'accès à cette ressource alimentaire. La compétition peut alors prendre différentes formes en fonction des espèces de parasitoïdes. Chez les espèces grégaires (chez lesquelles plusieurs larves peuvent se développer aux dépens d'un seul hôte), elle se traduira généralement par une simple compétition par exploitation. Ainsi, plus le nombre d'individus sur un hôte est important et plus la quantité de nourriture disponible pour chacun est faible. Par conséquent, plus la compétition est intense sur un hôte et plus les adultes émergeant de cet hôte seront petits (la taille de l'adulte dépendant directement de la quantité de ressources disponibles lors du développement). Or, il a été montré que la taille d'un parasitoïde peut être corrélée avec son succès reproducteur (Wang & Messing, 2004; Lacoume et al., 2006). La compétition larvaire est donc directement synonyme de baisse de fitness. On parle généralement chez les espèces grégaires d'une compétition de type « **scramble** » car les larves se « bousculent » pour accéder à la ressource sans qu'il n'y ait

directement d'agression physique entre elles (Visser, 1996; Mayhew & Hardy, 1998). Cependant, une larve a besoin d'une quantité minimale de nourriture pour survivre. Pour un hôte de taille donné, il existe donc un nombre maximal de larves pouvant s'y développer. Lorsqu'un nombre d'œufs pondus sur cet hôte est plus important, on peut alors observer une certaine mortalité parmi ces individus (Boivin & van Baaren, 2000). On peut alors parler de compétition par **suppression physiologique**, la suppression de la source de nourriture empêchant le développement de certaines larves (Vinson & Hegazi, 1998), mâles et femelles n'étant pas forcément égaux face à cette compétition. En effet, lorsque la compétition est intense, les femelles souffrent en général d'une plus grande mortalité que les mâles (Wylie, 1966; Suzuki et al., 1984). Ceci est probablement dû à un développement généralement plus rapide des mâles qui nécessite par conséquent moins de ressource (Waage, 1986).

Chez les espèces solitaires, un seul adulte pourra émerger d'un hôte donné, quel que soit le nombre d'œufs initialement pondus sur cet hôte. Contrairement aux espèces grégaires, les larves vont interagir physiquement pour accéder à la source de nourriture qu'est l'hôte. Après l'éclosion, les larves de premiers stades cherchent activement la présence de compétiteurs, œufs ou larves (van Alebeek et al., 1993). Lorsque plusieurs œufs sont pondus sur le même hôte, soit ils sont éliminés par une larve déjà présente (**Figure 3**), soit les larves se livrent à des combats mortels dans le cas où plusieurs œufs sont parvenus à éclore (Quicke, 1997). L'issue de ces **combats larvaires** dépend de différents facteurs. Tout d'abord, l'intervalle de temps entre les deux pontes. On observe généralement une forte diminution de la probabilité qu'une deuxième larve gagne le combat lorsque l'intervalle de temps entre les deux pontes augmente (Visser et al., 1992; van Baaren & Nénon, 1996; Goubault et al., 2003). Ceci est dû au fait que le premier œuf pondu éclora en premier et que la larve issue de cet œuf pourra s'attaquer aux autres œufs avant qu'ils éclosent à leurs tours. Ainsi, plus le deuxième œuf est pondu tard après le premier, et plus la première larve aura de temps pour trouver ce deuxième œuf pour le détruire. L'autre facteur influençant l'issue des combats est l'aptitude des larves à combattre. Cette aptitude peut dépendre de l'espèce (Jervis & Copland, 1996) mais également du sexe de

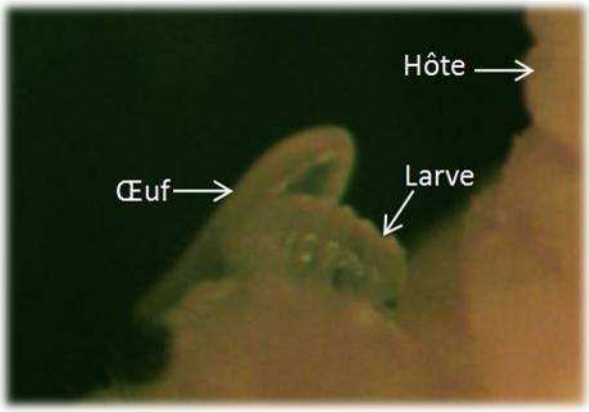

Figure 3 Larve de l'ectoparasitoïde *Anisopteromalus calandrae* s'attaquant à un œuf conspécifique à la surface de son hôte (*Callosobruchus maculatus*).

la larve au sein d'une même espèce, comme c'est le cas chez *Anaphes victus* (van Baaren et al., 1999). Elle est souvent liée à des adaptations morphologiques comme la présence de mandibules plus ou moins larges (Salt, 1961; Jervis & Copland, 1996) ou de soies facilitant la locomotion (van Baaren et al., 1997; van Baaren et al., 1999). C'est notamment cette deuxième caractéristique qui semble conférer un avantage aux femelles du parasitoïde *Anaphes victus* lors des combats larvaires, celles-ci ayant plus de soies que les mâles (van Baaren et al., 1999).

Une compétition de type suppression physiologique existe également chez les espèces solitaires, plus commune que celle mentionnée plus tôt chez les espèces grégaires (suppression de la ressource de nourriture par exploitation) mais moins répandue que les combats directs (Jervis & Copland, 1996). Elle s'exprime par l'émission de toxines par les larves les plus vielles peu de temps après l'éclosion (Jervis & Copland, 1996; Uka et al., 2006). Ces toxines empêchent alors les autres œufs d'éclore ou bloquent le développement des compétiteurs lors du premier stade larvaire (Govind et al., 2000).

Chez les femelles adultes, la compétition va influencer leurs stratégies de ponte de différentes manières. Tout d'abord, il faut savoir que chez les femelles adultes on retrouve également les deux types de compétition : par exploitation et par interférence. La compétition par exploitation se produit lorsque des femelles exploitent successivement un même patch d'hôtes, contrairement à la compétition par interférence où plusieurs femelles se retrouvent à exploiter le même patch en même temps.

Pour les femelles adultes, l'hôte peut non seulement représenter une ressource nutritive pour leur descendance et donc être utilisé pour la ponte mais également être considéré comme une source de nourriture pour elles mêmes chez certaines espèces. Ainsi, certaines femelles parasitoïdes sont capables de s'alimenter sur l'hôte directement en ponctionnant son hémolymphe (« **host-feeding** » en anglais) (Pupedis, 1978; Jervis & Kidd, 1986; Giron et al., 2002), ou bien en se nourrissant de ses sécrétions comme le miellat du puceron (Fuchsberg et al., 2007; Hogervorst et al., 2007). Dans ce cas, la quantité de ressource prélevée est souvent faible et l'hôte peut ensuite être réutilisé par d'autres femelles, aussi bien pour se nourrir à leur tour que pour pondre. Lorsque les femelles utilisent l'hôte comme source de nourriture la compétition est donc peu importante. Cependant, chez certaines espèces, le prélèvement d'hémolymphe par un parasitoïde peut tuer l'hôte et le rendre inutilisable pour une ponte ultérieure (Jervis & Kidd, 1986; Ueno, 1999a). L'exploitation d'hôtes par une femelle pour l'alimentation peut ainsi réduire la quantité d'hôtes disponible à la ponte pour d'autres femelles. Si cette double valeur de l'hôte peut

avoir un impact sur les stratégies de ponte des femelles en compétition, elle peut également influencer les stratégies de reproduction d'une femelle seule. Ainsi, lorsqu'une femelle est confrontée à un hôte, elle devra faire le choix entre pondre et donc investir dans la reproduction immédiate ou s'alimenter, ce qui aura pour effet d'augmenter l'ovogénèse et la longévité, et donc augmenter la probabilité de pouvoir pondre ultérieurement (Kidd & Jervis, 1991). Ce **compromis entre reproduction immédiate et future** a été d'ailleurs relativement bien étudié chez les parasitoïdes (Heimpel & Rosenheim, 1995; McGregor, 1997; Burger et al., 2004).

Il est également possible que certaines caractéristiques des compétitions larvaires exposées précédemment puissent entrer en ligne de compte dans la compétition des femelles adultes pour l'accès aux hôtes. En effet, dès lors que la compétition larvaire entraîne une baisse de fitness, il parait important pour une femelle d'éviter de pondre sur un hôte déjà parasité. Si ceci est vrai à la fois pour les espèces grégaires et solitaires, ça l'est d'autant plus pour ces dernières. Chez les espèces solitaires, les combats larvaires entraînent directement une augmentation de la mortalité dans la descendance des femelles. Ainsi, il a été montré chez de nombreuses espèces que les femelles sont capables de distinguer des hôtes non parasités et déjà parasités (van Lenteren, 1981; van Alphen & Nell, 1982; Gauthier et al., 1996; Okuda & Ceryngier, 2000; Santolamazza-Carbone et al., 2004; Zappala & Hoy, 2004; Darrouzet et al., 2007). Il est toutefois commun d'observer des femelles parasitoïdes pondre sur cette deuxième catégorie d'hôtes. Cette stratégie appelée **superparasitisme** a longtemps été considérée comme non adaptative (van Lenteren, 1981). De nos jours, il est globalement accepté que le superparasitisme peut être adaptatif dans certaines circonstances (van Alphen & Nell, 1982; van Alphen & Visser, 1990). C'est notamment le cas lorsque la proportion d'hôtes non parasités est faible ou bien que les trajets entre les différents patchs de ponte sont longs (van Alphen & Visser, 1990). Il existe deux types de superparasitisme : le **superparasitisme conspécifique** lorsqu'une femelle pond sur un hôte déjà parasité par une autre femelle et le **self-superparasitisme** lorsqu'une femelle dépose plusieurs pontes sur le même hôte (Godfray, 1994). Alors qu'il peut paraître aisé de comprendre que le superparasitisme conspécifique puisse être avantageux, de prime abord, le self-superparasitisme paraît peu adaptatif. En effet, chez les espèces solitaires, si une femelle pond deux œufs sur le même hôte, au moins un des deux est voué à mourir (Godfray, 1994). Il a d'ailleurs été observé chez certaines espèces que les femelles pondent d'avantage sur des hôtes parasités par d'autres femelles que sur des hôtes parasités par elles-mêmes (van Dijken et al., 1992; Ueno, 1994). Il existe cependant certaines conditions sous lesquelles le self-

superparasitisme devient avantageux. En fait, il est avantageux de pondre plusieurs œufs sur le même hôte si la probabilité d'obtenir un descendant sur cet hôte s'en trouve augmentée (van Alphen & Visser, 1990). Prenons l'exemple d'une femelle dont le descendant doit combattre avec une larve compétitrice sur un hôte. Il est probable que si la femelle avait produit non pas un mais deux descendants sur cet hôte, elle aurait plus de chances que l'un de ses descendants sorte victorieux de cette compétition (Yamada & Sugaura, 2003). De même, lorsque le niveau de compétition est élevé et que les compétitrices pondent préférentiellement sur des hôtes sur lesquels uniquement un œuf est présent, le fait de pondre directement deux œufs sur un hôte peut réduire la probabilité de se faire superparasiter (Ito & Yamada, 2007). C'est généralement lors des premiers stades de développement que les larves sont mobiles et capables de se battre. Ensuite, elles se fixent sur l'hôte afin de se nourrir de ses tissus avant d'entrer en nymphose. A ce stade, elles sont incapables de se défendre. Ainsi, chez certaines espèces, les femelles peuvent pondre sur les larves ou nymphes de parasitoïdes de la même espèce ou d'espèces différentes lorsque la quantité d'hôtes sains vient à manquer (**hyperparasitisme**) (van Baaren et al., 1995; Kalmes et al., 1999; Perez-Lachaud et al., 2004; Rojas-Rousse et al., 2005).

Une dernière stratégie pouvant être employée par des femelles parasitoïdes confrontées à un hôte déjà parasité est l'**ovicide**. Cette stratégie consiste à détruire un premier œuf pondu sur un hôte pour ensuite y pondre ses propres œufs (Godfray, 1994; Netting & Hunter, 2000). Elle permet ainsi de rétablir la qualité première de l'hôte et ainsi éviter les combats larvaires entre ses descendants et ceux d'autres femelles. La fitness des descendants de femelles pratiquant l'ovicide peut ainsi être supérieure à celle des descendants de femelles faisant du superparasitisme (Mayhew, 1997). Certaines femelles peuvent alors garder l'hôte qu'elles ont parasité afin de prévenir un ovicide et ainsi augmenter la probabilité de survie de ses descendants (Field et al., 1998). C'est notamment le cas des femelles *Goniozus nephantidis* qui défendent leurs descendants contre la venue d'autres femelles en se battant contre elles pour les tenir éloignées de l'hôte (Goubault et al., 2007).

La présence de compétitrices ainsi que les stratégies qu'elles emploient pourront également influencer les stratégies de ponte d'autres femelles, en jouant à la fois sur leurs stratégies globales d'exploitation du patch (durée d'exploitation, choix des hôtes) mais également sur leurs sex-ratios de ponte. Concernant l'exploitation des patchs de ponte et plus particulièrement le temps investi dans cette exploitation, la présence de compétiteurs peut affecter les stratégies des femelles de différentes manières. Lorsqu'une femelle quitte un patch de ponte, les hôtes qu'elle a parasités risquent d'être superparasités par d'autres femelles.

Pour pallier la perte de descendants liée à ce superparasitisme, il peut être avantageux pour les femelles de rester plus longtemps afin de pondre elles-mêmes sur des hôtes déjà parasités par des conspécifiques (van Alphen & Bernstein, 2008). Elles se trouvent alors engagées dans une **guerre d'usure** (« **war of attrition** ») où chacune doit essayer de rester plus longtemps que les autres (Maynard Smith, 1974). La durée optimale de séjour dans le patch peut alors dépendre de la perception du moment d'arrivée des compétitrices lorsque celles-ci pénètrent dans le patch à différents instants (Haccou & van Alphen, 2008). Ceci a pour effet d'augmenter la durée d'exploitation des patchs de ponte en situation de compétition. Inversement, il peut également arriver que certaines femelles aient tendance à quitter prématurément le patch de ponte lorsque la compétition s'intensifie (Goubault et al., 2005).

Chez le parasitoïde solitaire *Pachycrepoideus vindemmiae* la stratégie employée par les femelles dépend de leur état physiologique. Ainsi, les femelles les plus vieilles ont tendance à rester plus longtemps sur le patch (Goubault et al., 2005). La compétition peut également influencer le choix du patch, même lorsque les compétiteurs appartiennent à des espèces différentes. Le parasitoïde *Leptopilina heterotoma* par exemple, évite les patchs sur lesquels une espèce proche, *Leptopilina clavipes*, est présente (Janssen et al., 1995a; Janssen et al., 1995b). Il évite ainsi d'entrer en compétition avec une espèce dont les descendants ont un avantage compétitif sur les siens lors des combats larvaires (Janssen et al., 1995a).

Finalement, la présence de femelles conspécifiques peut également affecter le sex-ratio de ponte des femelles parasitoïdes hyménoptères. Les parasitoïdes hyménoptères sont des espèces haplodiploïdes se reproduisant par parthénogenèse arrhénotoque. Ainsi, les mâles sont issus d'œufs non fécondés alors que les femelles, quant à elles, sont issues d'œufs fécondés. Ce système de reproduction permet aux femelles de ces espèces de choisir le sexe des œufs qu'elles pondent et donc d'ajuster leurs sex-ratios de ponte (Godfray, 1994).

Différentes notions du sex-ratio peuvent apparaître en fonction du niveau auquel on s'intéresse. Ainsi, le sex-ratio primaire se réfère au sexe des œufs pondus, alors que le sex-ratio secondaire renvoie au sexe des individus survivants après l'éclosion ou l'émergence des adultes et tient donc compte de la mortalité intrinsèque de chaque sexe lors du développement embryonnaire ou larvaire. Certains auteurs parlent même de sex-ratio tertiaire pour les individus émergeants après combats larvaires chez les parasitoïdes solitaires (van Baaren et al., 1999).

Comme prédit par la théorie de la *Local Mate Competition* (voir planche 2), plus le nombre de femelles présentent sur un patch de ponte est important, plus la proportion de mâles produits par chaque femelle (sex-ratio primaire) doit être élevée. Cette prédiction a été

Planche 2 - La théorie de la *Local Mate Competition*

La théorie de la *Local Mate Competition* développée par Hamilton (1967) part du principe que dans une population, les mâles vont entrer en compétition pour pouvoir s'accoupler avec les femelles. Ainsi, en considérant une espèce vivant dans un environnement composé de patchs et qu'à chaque génération, les femelles se dispersent, après s'être accouplées, pour coloniser d'autres patchs, si une seule femelle fondatrice colonise un patch donné, ses fils seront en compétition les uns avec les autres pour accéder aux femelles. Pour limiter la compétition parmi ses propres fils, Hamilton prédit que la femelle fondatrice devra produire uniquement le nombre minimum de mâles capables d'inséminer l'ensemble de ses filles.

Plus le nombre de femelles fondatrices sur un patch augmente, et plus la proportion de fils produits par chaque femelle devra être importante afin d'augmenter la probabilité que ceux-ci puisse gagner la compétition fasse aux fils des autres fondatrices (**Figure 4**).

Cette théorie a ensuite été reprise dans de nombreuses études et adaptée aux caractéristiques de diverses espèces (Suzuki & Iwasa, 1980; Abe et al., 2003; Shuker et al., 2005).

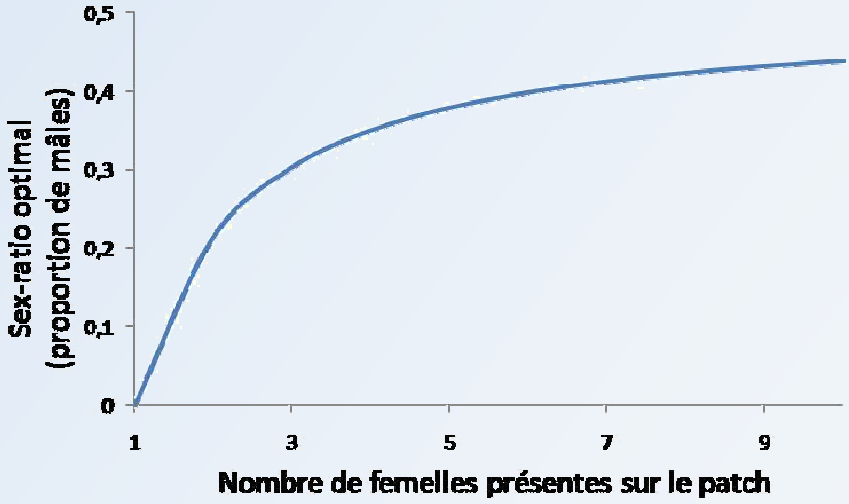

Figure 4 Sex-ratio de ponte (proportion de mâles) optimal prédit par la théorie de la Local Mate Competition pour des espèces haplodiploïdes. D'après Godfray (1994).

vérifiée à de nombreuses reprises chez les hyménoptères parasitoïdes (Herre, 1985; Herre, 1987; Rabinovich et al., 2000; Debout et al., 2002; Darrouzet et al., 2008) et est valable tant pour les espèces grégaires que les espèces solitaires se reproduisant sur des agrégats d'hôtes et pouvant ainsi être considérées comme semi-grégaires (Godfray, 1994). La théorie de la *Local*

Mate Competition est également applicable aux situations de compétitions indirectes où des femelles isolées sont confrontées à des patchs de ponte déjà en partie ou totalement parasités (Werren, 1980; Shuker & West, 2004; Shuker et al., 2006; Darrouzet et al., 2007). Shuker et West (2004) ont même montré que la présence d'œufs pondus est un facteur primordial à l'adaptation du sex-ratio de ponte. Ainsi, lorsqu'elles sont confrontées à des compétitrices dans l'incapacité de pondre, les femelles *Nasonia vitripenis* n'ajustent pas leur sex-ratio de ponte et adoptent un comportement similaire à des femelles en absence de compétition (Shuker & West, 2004). Imaginons maintenant que les femelles parasitoïdes soient capables de percevoir le sexe d'œufs déjà pondus par des femelles de la même espèce. Dans ce cas, le sex-ratio optimal produit par une femelle dépendra du sex-ratio de la première ponte. C'est ce que prédit Hamilton (1967) avec son modèle du *Sex Ratio Games*. Selon ce modèle, une femelle devra pondre une plus grande proportion de mâles lorsqu'une proportion importante de femelles a déjà été pondue (**Figure 5**), mais cette prédiction n'a jamais été vérifiée expérimentalement.

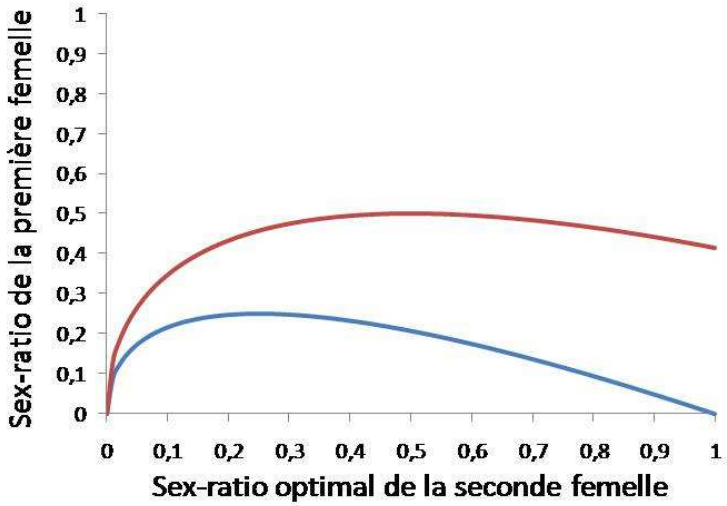

Figure 5 Sex-ratios optimaux prédits par le modèle du *Sex Ratio Games*. La ligne bleue représente le sex-ratio conférant à la deuxième femelle la plus grande fitness. La ligne rouge représente quant à elle le sex-ratio conférant à la deuxième femelle une fitness supérieur à la première.

Localisation et discrimination de l'hôte : importance des signaux chimiques

Comme nous l'avons vu, la compétition peut affecter de manière importante les stratégies de ponte et la fitness des parasitoïdes. Il est par conséquent important pour les femelles parasitoïdes, d'une part de localiser efficacement leurs hôtes potentiels, et d'autre part de déterminer rapidement leur qualité. Bien qu'il soit possible que les parasitoïdes utilisent des

stimuli de nature vibratoire (Van den Assem & Kuenen, 1958; Meyhöfer & Casas, 1999) ou visuelle (Segura et al., 2007) pour localiser leurs hôtes, les informations chimiques jouent un rôle primordial dans cette fonction (Hilker & McNeil, 2008). Ainsi, des signaux chimiques originaires des différents niveaux trophiques peuvent renseigner un parasitoïde sur la localisation, la nature et la qualité d'un hôte.

Concernant la localisation de l'hôte, le parasitoïde doit tout d'abord localiser l'habitat de celui-ci. Dans le cas de parasitoïdes d'insectes phytophages, les femelles sont généralement attirées par des composés volatils émis par les plantes sur lesquelles vivent leurs hôtes. Il peut même arriver que le parasitoïde utilise des signaux volatils émis par les plantes attaquées par l'hôte afin de s'orienter préférentiellement vers celles-ci plutôt que vers des plantes saines (Petitt et al., 1992; NgiSong et al., 1996). Le maïs par exemple réagit aux agressions causées par les phytophages en émettant des terpènes (Turlings et al., 1990). Ce mécanisme de défense général des plantes est déclenché par les dommages physiques engendrés par les mandibules des insectes se nourrissant des feuilles en association avec une substance présente dans leur salive (Turlings et al., 1993; Turlings et al., 2000). Ces terpènoïdes ainsi produits pourront attirer les parasitoïdes qui iront pondre sur ces insectes phytophages (Turlings et al., 1990; Turlings et al., 1995). La fève *Vicia faba*, quant à elle, émet une substance quand elle est attaquée par des pucerons, le (E)-ß-farnesene (Du et al., 1998), qui se trouve être la phéromone d'alarme de la plupart des espèces de pucerons (Pickett et al., 1992). Ceci a pour effet, non seulement de repousser les autres pucerons, mais également d'attirer leurs parasitoïdes (Beale et al., 2006). Avec la biomasse relativement importante que représentent les feuilles attaquées, ces composés volatils sont produits en relativement grandes quantités (de l'ordre de quelques milligrammes), leur permettant d'être facilement détectés par les parasitoïdes (Turlings et al., 1995; Hilker & McNeil, 2008). La localisation des hôtes grâce à ces signaux et probablement la distance à laquelle ils sont détectés peut alors dépendre du contexte dans lequel ils sont émis, à savoir l'importance du bruit de fond constitué par les autres volatiles présents dans l'environnement (Hilker & McNeil, 2008) ainsi que des facteurs abiotiques tels que l'humidité, la température, la luminosité, la pluie ou bien le vent (Fink & Völkl, 1995; Gu & Dorn 2001; Schwörer & Völkl, 2001).

D'autres signaux chimiques peuvent être utilisés, conjointement ou indépendamment de ceux exposés précédemment. Ces signaux sont directement liés à l'activité des hôtes. C'est le cas du parasitoïde *Cotesia marginiventris*, qui après s'être orienté vers les plantes attaquées par son hôte, la chenille *Spodoptera frugiperda*, le localise plus précisément à l'aide de

kairomones[2] (alcanes linéaires) laissées sur son passage (Rostas & Wölfling, 2009). D'autres parasitoïdes, comme ceux parasitant spécifiquement leurs hôtes aux stades embryonnaires (œufs) ou larvaires, utilisent principalement des substances chimiques laissées par l'adulte pour localiser leur hôte. Les femelles parasitoïdes *Trissolcus basalis*, par exemple, détectent des résidus, constitués d'alcanes linéaires (essentiellement du n-nonadecane), déposés par les femelles adultes *Nezara viridula* en marchant sur le substrat pour localiser leurs œufs (Colazza et al., 1999; Peri et al., 2006; Colazza et al., 2007). Certains parasitoïdes perçoivent également le marquage de ponte laissé par les hôtes adultes pour repérer la présence d'œufs ou de larves, notamment lorsque ces derniers se trouvent à l'intérieur du substrat et ne sont donc pas directement accessibles. Les femelles *Dinarmus basalis* et *Anisopteromalus calandrae* par exemple se servent du marquage déposé par les femelles de la bruche *Callosobruchus chinensis* au moment de la ponte pour localiser les larves présentes à l'intérieur de graines (Kumazaki et al., 2000; Onodera et al., 2002). *D. basalis* se base sur un mélange d'hydrocarbures saturés et de diacylglycérols, alors qu'*A. calandrae* utilise un mélange de triacylglycérol et d'acide gras pour détecter la présence potentiel de leurs hôtes (Kumazaki et al., 2000; Onodera et al., 2002). D'autres parasitoïdes peuvent aussi utiliser des kairomones présentes dans les fèces des hôtes (en partie des alcools) pour les localiser (Mattiacci et al., 1999; Steiner et al., 2007).

Une fois l'hôte localisé, le parasitoïde doit être capable de déterminer sa nature et sa qualité afin de décider soit de le parasiter, soit de le rejeter. Cet aspect est d'autant plus important dans un contexte de compétition par exploitation car les parasitoïdes vont être confrontés à certains hôtes déjà parasités. Les femelles parasitoïdes ont donc tout intérêt à discriminer les hôtes parasités de ceux qui ne le sont pas, et c'est d'ailleurs le cas dans la plupart des espèces chez lesquelles cela à été étudié (van Alphen & Nell, 1982; Takasu & Hirose, 1988; Barrera et al., 1994; Gauthier et al., 1996; Okuda & Ceryngier, 2000; Outreman et al., 2001; Agboka et al., 2002; Ardeh et al., 2005; Darrouzet et al., 2007; Mehrnejad & Copland, 2007; Mahmoud & Lim, 2008). Comment ces parasitoïdes sont-ils capables de faire cette distinction ? Tout d'abord, il est possible que chez certaines espèces d'ectoparasitoïdes (dont les larves se développent à la surface de l'hôte), les femelles puissent directement détecter la présence d'œufs conspécifiques à la surface des hôtes parasités. Mais dans le cas d'endoparasitoïdes (chez lesquels la larve se développe à l'intérieur de l'hôte) et même

[2] Contrairement aux phéromones qui sont des substances chimiques induisant une réponse physiologique ou comportementale chez un individu de la même espèce, une kairomone fait référence à une substance chimique émise par un organisme et utilisée par un individu d'une autre espèce à son avantage.

d'ectoparasitoïdes dont l'hôte se trouve à l'intérieur du substrat (fruit, graine, plante…) les œufs précédemment pondus ne sont pas directement accessibles aux femelles. Dans ce cas, à l'instar des femelles hôtes, les femelles parasitoïdes déposent souvent un marquage de ponte, permettant aux autres femelles de détecter la présence d'une ponte antérieure (Barrera et al., 1994; Hoffmeister, 2000; Stelinski et al., 2007), permettant ainsi à ces dernières d'éviter de pondre sur des hôtes déjà parasités et prévenant les premières femelles de cas de superparasitisme. Certains parasitoïdes se reproduisant sur des hôtes vivant en patchs peuvent également marquer le patch entier après avoir parasité un hôte (Hoffmeister & Roitberg, 1997). Ce marquage permet non seulement aux femelles de repérer un hôte déjà parasité, mais parfois également de déterminer si la première ponte à été réalisée par elle-même, par une femelle conspécifique ou bien par une femelle d'une autre espèce (van Dijken et al., 1992; Agboka et al., 2002). D'autres parasitoïdes perçoivent des modifications physiologiques de l'hôte suite au parasitisme. Chez les endoparasitoïdes, ces changements peuvent être liés au développement de la première larve à l'intérieur de l'hôte, induisant des modifications de son hémolymphe (van Baaren & Nénon, 1994). La femelle parasitoïde peut alors détecter ces modifications à l'aide de récepteurs gustatifs présents à l'extrémité de son ovipositeur (Brown & Anderson, 1998; van Lenteren et al., 2007).

Il est également possible que plusieurs signaux renseignent sur le statut parasité d'un hôte pour une même espèce de parasitoïde. Chez le parasitoïde *Pachycrepoideus vindemmiae* par exemple, il a été montré que deux populations de cette espèce utilisent des stratégies différentes pour cette discrimination. Alors que l'une détermine si un hôte est parasité à l'aide d'un marquage externe (l'hôte parasité étant rejeté après contact antennaire), l'autre utilise un stimulus interne (l'hôte parasité est rejeté après introduction de l'ovipositeur) (Goubault et al., 2004). Parfois, l'utilisation de l'un des signaux dépend du temps écoulé depuis la première ponte. C'est le cas d'*Anagyrus pseudococci*, un endoparasitoïde de la cochenille *Planococcus citri*. Les femelles rejettent les hôtes déjà parasités soit après contact antennaire, soit après avoir introduit leur ovipositeur. Bien qu'elles utilisent principalement la perception antennaire d'un marquage externe, l'utilisation d'un stimulus interne se fait plus importante lorsque le temps écoulé depuis la première ponte augmente (Islam & Copland, 2000). De la même manière, chez le parasitoïde de puceron *Aphidius rhopalosiphi*, le rejet d'hôtes parasités est corrélé à la présence d'une sécrétion sur le corps du puceron, dans les huit heures qui suivent le premier parasitisme, dont l'un des constituants serait la phéromone d'alarme évoquée plus tôt. Ensuite, à partir de 16 heures, le rejet est principalement associé à un signal interne perçu lors de l'introduction de l'ovipositeur par la femelle (Outreman et al., 2001). Ces résultats

indiquent que plusieurs signaux chimiques, se succédant dans le temps peuvent renseigner le parasitoïde sur le statut parasité de l'hôte. La perception de l'un ou l'autre de ces stimuli pourrait ainsi être à l'origine de la discrimination du temps écoulé depuis une première ponte observée chez certains parasitoïdes (Yamada & Ikawa, 2005; Goubault et al., 2003).

Objectifs de la thèse

L'accès aux hôtes, et tout particulièrement à des hôtes de bonne qualité, à un impact direct et important pour la fitness des femelles parasitoïdes. Le niveau de compétition auquel elles sont confrontées peut alors influencer de manière conséquente les stratégies comportementales adoptées par les femelles. Si bon nombre d'études se sont intéressées à ce sujet, une part importante d'entre elles s'est focalisée sur les espèces grégaires. S'il est vrai que chez ces espèces la compétition larvaire influence la fitness des femelles adultes et de leurs descendants, c'est chez les espèces solitaires que cette compétition a les conséquences les plus importantes. En effet, chez ces dernières, à cause notamment des combats larvaires, le simple fait, pour une femelle, de pondre ses œufs sur des hôtes déjà parasités réduit de moitié le nombre de ses descendants atteignant l'âge adulte (Visser et al., 1992; van Baaren & Nénon, 1996; Goubault et al., 2003). Les femelles des espèces solitaires sont donc soumises à de fortes pressions de sélection qui doivent les contraindre à discriminer finement les différents types d'hôtes auxquels elles sont confrontées.

Parmi ces différents types d'hôtes, il y a d'un côté les hôtes non parasités, et de l'autre les hôtes déjà parasités. Mais au sein même des hôtes parasités, tous ne sont pas de qualité égale, ou dans un même état de parasitisme. Ainsi, la probabilité de survie d'un individu ne sera pas forcément la même sur tous les hôtes parasités. Ces différences sont généralement dûes à certains facteurs affectant l'issue des combats larvaires. C'est notamment le cas du temps écoulé depuis la première ponte ou bien encore du sexe des larves en compétition lorsqu'il existe une asymétrie dans l'aptitude à combattre entre mâles et femelles. Or, l'impact de ces facteurs sur les stratégies de ponte de femelles adultes a été assez peu étudié. En 2003, Goubault et al. ont montré que les femelles du parasitoïde solitaire *Pachycrepoideus vindemmiae* pondent préférentiellement sur des hôtes récemment parasités (sur lesquels les œufs n'ont pas encore éclos) que sur ceux sur lesquels une larve est déjà en train de se développer. Cependant, avec la capacité des larves à tuer les œufs pondus après elles, un œuf pondu sur un hôte sur lequel une larve est déjà présente n'a probablement que très peu de chance de survivre. Le temps qui suit la première ponte est donc une période cruciale pour une femelle pondant en condition de superparasitisme. Lorsque l'intervalle de temps entre

deux pontes est faible, l'éclosion des œufs est rapprochée et les larves devraient avoir par conséquent sensiblement les mêmes chances de survie. Mais lorsque le deuxième œuf est pondu peu de temps avant l'éclosion du premier, sa probabilité de survie devrait considérablement diminuer. En effet, la larve issue de ce premier œuf aura, dans ce cas, le temps de détruire le deuxième œuf avant qu'il n'éclose à son tour. Or, aucune étude n'a à ce jour montré si une femelle parasitoïde était capable de distinguer un hôte qui vient juste d'être parasité d'un hôte parasité par un œuf sur le point d'éclore.

Un deuxième facteur pouvant affecter de manière considérable l'issue des combats larvaires est le sexe des larves. En effet, larves mâles et femelles n'ont pas forcément les mêmes aptitudes au combat, de par les différences morphologiques qui peuvent exister entre les larves des deux sexes. Pourtant, bien que certaines études montrent que chez certaines espèces, les femelles remportent plus souvent les combats que les mâles (van Baaren et al., 1999; Darrouzet et al., 2003), cet aspect n'a fait l'objet que de peu d'attention dans l'étude de la compétition larvaire. Ces études présentent certaines difficultés car le sexe d'un individu ne peut généralement pas être connu au stade œuf sans utiliser de techniques invasives entraînant la mort de celui-ci. Son sexe est généralement identifié après émergence de l'adulte. Mais chez les espèces solitaires, du fait des combats larvaires, un seul individu parvient jusqu'au stade adulte, ce qui empêche de connaître le sexe de l'autre compétiteur. De même, aucune étude n'a jamais démontré qu'une femelle parasitoïde était capable de déterminer le sexe d'œufs préalablement pondus pour adapter ses stratégies de ponte en conséquence.

Les hôtes peuvent être utilisés aussi bien comme ressource de ponte que source de nourriture par les femelles adultes. Les critères déterminant la qualité de l'hôte peuvent donc varier en fonction des besoins des femelles. Un hôte parasité sera de moins bonne qualité pour la ponte. Il est par conséquent possible que les femelles parasitoïdes préfèrent s'alimenter aux dépens d'hôtes déjà parasités, réservant les hôtes non parasités pour la ponte. De plus, suite au premier parasitisme, il arrive que les hôtes subissent des modifications métaboliques. Dans certains cas, ces modifications entraînent une augmentation de la concentration en lipides dans l'hémolymphe de l'hôte (Rivers & Denlinger, 1995; Nakamatsu & Tanaka, 2003), faisant d'un hôte parasité une meilleure source de nutriments. Cependant, cet aspect n'a jamais été pris en compte dans les études sur les compromis entre reproduction immédiate (ponte) et reproduction future (alimentation).

Malgré l'intérêt porté à l'étude de la compétition chez les parasitoïdes, de nombreuses questions restent encore sans réponses à ce jour. La compétition larvaire affecte la probabilité de survie des larves et donc la fitness de leur mère. Par conséquent, les femelles adultes sont-

elles capables de percevoir les caractéristiques des œufs préalablement pondus par des femelles conspécifiques ? Sont-elles capables de distinguer des œufs qui viennent d'être pondus et des œufs sur le point d'éclore ? Peuvent-elles faire la différence entre œufs mâles et femelles ? Le statut parasité de l'hôte influence-t-il le compromis entre reproduction immédiate et reproduction future ?

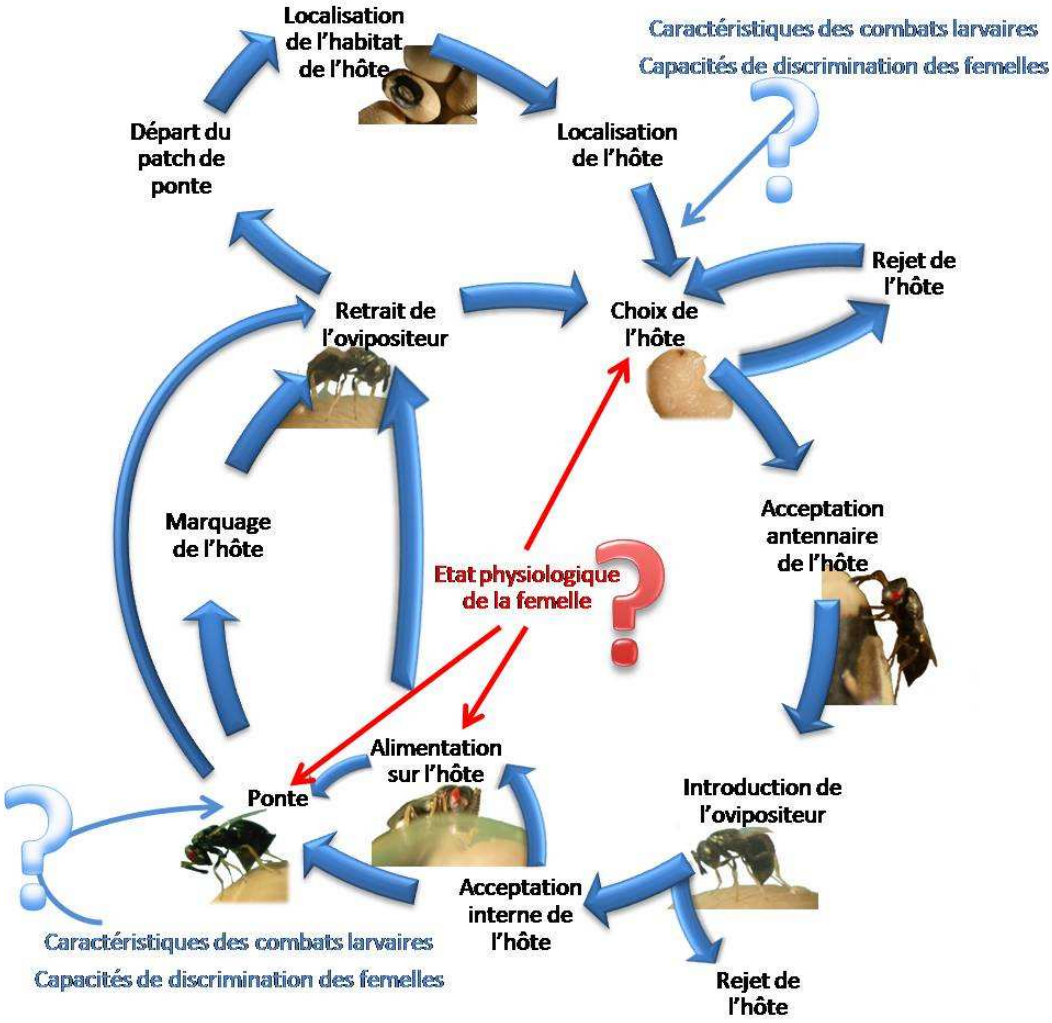

Figure 6 Schéma récapitulatif des questions abordées lors de la thèse. Nous étudierons les capacités de discrimination des femelles *A. calandrae* lorsqu'elles sont confrontées à différents types d'hôtes. Nous verrons ainsi comment ces capacités ainsi que la probabilité de survie de leurs descendants affectent leur cycle de ponte au niveau du choix de l'hôte et directement au niveau de la ponte (essentiellement en termes de sex-ratio). Nous verrons également comment les stratégies adoptées par les femelles (choix de l'hôte, ponte et alimentation) dépendent de leur état physiologique.

L'objectif de cette thèse est donc de répondre à ces questions en étudiant les stratégies de ponte d'un ectoparasitoïde solitaire, *Anisopteromalus calandrae* dans un contexte de

compétition intraspécifique (**Figure 6**). Les études qui vont suivre s'intéressent à la fois à la compétition larvaire et à la compétition par exploitation chez les femelles adultes, lorsqu'elles sont confrontées à des patchs d'hôtes déjà parasités en partie ou complètement. Plus particulièrement, nous verrons comment les caractéristiques influençant l'issue de la compétition larvaire (intervalle de temps entre deux pontes, sexe des compétiteurs) peuvent influencer les stratégies employées par les femelles adultes (choix de l'hôte, sex-ratio, compromis ponte / alimentation…).

Cette thèse s'articule autours de trois parties. La première partie décrit en détail le système graine-ravageur-parasitoïde ainsi que les principaux outils expérimentaux utilisés pour répondre aux questions posées ; à savoir un marqueur phénotypique permettant de suivre la descendance d'un femelle et un système de graines artificielles permettant de calibrer les différents paramètres étudiés au cours de ces études.

La deuxième partie vise à étudier le compromis entre reproduction immédiate et reproduction future. En effet, un hôte parasité peut être considéré comme étant de mauvaise qualité pour la ponte, mais avoir une bonne valeur nutritive. La présence d'hôtes parasités dans un patch d'exploitation peut alors influencer ce compromis. Le but de cette étude est donc de savoir si le statut parasité de l'hôte peut influencer les stratégies de ponte des femelles parasitoïdes ainsi que de comprendre les mécanismes impliqués. De plus, ce compromis est connu pour être modulé par l'état physiologique des femelles. Nous verrons donc comment l'âge et les réserves nutritives des femelles peuvent affecter leur choix entre hôtes parasités et non parasités ainsi que les stratégies qu'elles emploient à leurs dépens (ponte ou alimentation).

La troisième partie, quant à elle, s'intéresse aux deux principaux facteurs influençant l'issue des combats larvaires : l'intervalle de temps écoulé entre deux pontes et le sexe des larves. L'objectif de cette étude est de comprendre comment ces deux facteurs peuvent influencer le comportement de ponte des femelles *A. calandrae* lorsqu'elles sont confrontées à différentes catégories d'hôtes (parasités depuis plus ou moins longtemps, par un œuf mâle ou femelle), que ce soit en termes de choix de l'hôte ou d'adaptation de leur sex-ratio de ponte. Nous étudiront également les mécanismes pouvant être impliqués dans la discrimination d'hôtes parasités à différents temps. Les signaux qui sont probablement impliqués dans les autres discriminations seront quant à eux discutés.

- PREMIERE PARTIE -

Présentation du système étudié et outils expérimentaux utilisés

Le système tritrophique

La plante hôte Vigna unguiculata

Vigna unguiculata ou Niébé est une légumineuse originaire des régions tropicales semi aride que l'on retrouve essentiellement en Afrique, mais également en Asie, en Amérique et autour du bassin méditerranéen. C'est une herbacée annuelle, autogame et présentant une grande variabilité de formes et pouvant atteindre plus de 80 cm de haut (**Figure 7**).

Sa résistance à la sécheresse et sa capacité à se développer sur des sols pauvres en engrais en font l'une des légumineuses les plus cultivées en Afrique occidentale. Les graines de niébé (**Figure 7**) sont riches en protéines et constituent un apport important en calories. Ainsi, ces dernières décennies, le niébé est passé d'une culture de subsistance à une culture de rente importante dans différents pays d'Afrique accroissant son importance économique (Adéoti et al., 2002).

Au laboratoire, la souche utilisée appartient à la variété Black-Eyes California.



Figure 7 Plants (à gauche) et graines (à droite) de Niébé *Vigna unguiculata*.

L'insecte phytophage Callosobruchus maculatus

La bruche *Callosobruchus maculatus* est un petit Coléoptère (environ 3 mm) de la famille des Bruchidés originaire d'Afrique et d'Asie. Un dimorphisme sexuel au niveau de la coloration des élytres permet de différentier aisément les mâles des femelles : alors que les mâles arborent une coloration brune unie, les femelles sont tachetées de noir (**Figure 8**).

C'est un ravageur de graines de légumineuses du genre *Vigna*. Les femelles pondent leurs œufs dans les champs de Niébé sur des gousses très mures ou directement sur les graines stockées. Les stocks de graines ravagés sont facilement reconnaissables à la présence de

l'enveloppe de l'œuf qui persiste après l'éclosion à la surface de la graine ainsi qu'aux loges nymphales creusées dans la graine, visibles par transparence lorsque les bruches ont atteint un stade larvaire avancés. De par le nombre important d'œufs pouvant être pondus (jusqu'à 40-60 œufs par graine) ainsi que le court temps de génération de la bruche (3 à 4 semaines en fonction des conditions environnementales), une faible infestation de départ peut conduire à la perte totale d' un stock de graines en quelques mois (Kitch & Ntoukam).

Après éclosion, la larve de bruche creuse un tunnel dans la graine jusqu'aux cotylédons dont elle se nourrit pendant les quatre stades larvaires. Après 18 jours de développement dans des conditions expérimentales de laboratoire (12 h de jours à 35°C, 12 h de nuit à 25°C, et 45% d'humidité), la larve de stade L_4 entre en nymphose. Après la mue imaginale, l'adulte sort de la graine dont il découpe l'opercule située au dessus de la loge nymphale grâce à ses mandibules (Gauthier, 1996).

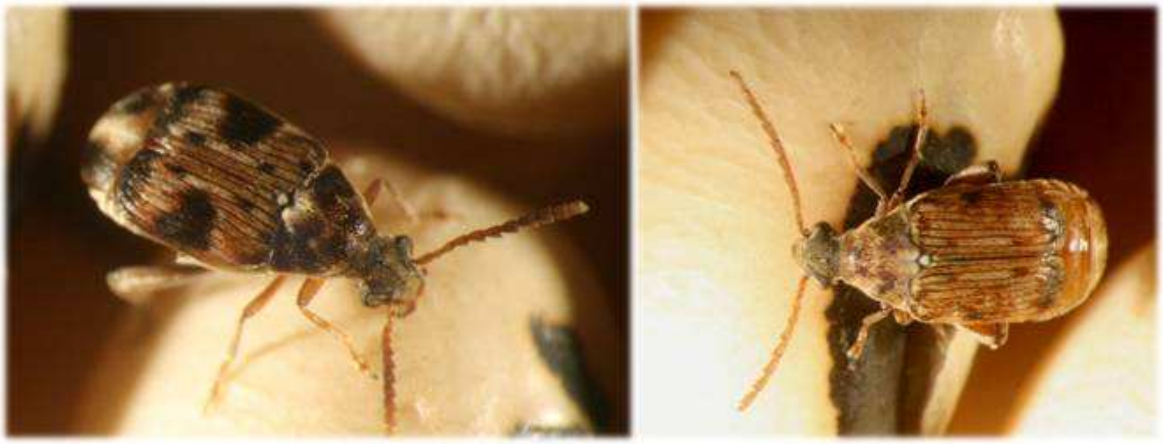

Figure 8 *Callosobruchus maculatus* femelle (à gauche) et mâle (à droite) dans un stock de graines de Niébé.

Le parasitoïde Anisopteromalus calandrae

Généralités

Anisopteromalus calandrae est un Hyménoptère de la famille des Ptéromalidés. C'est un parasitoïde généraliste qui s'attaque aux larves et nymphes de la plupart des espèces de Coléoptères ravageurs de graines. Originaire d'Afrique et du Sud Est asiatique, son utilisation comme agent de lutte biologique à travers le monde a fait d'*A. calandrae* une espèce cosmopolite (Islam & Nargis, 1994; Ahmed et al., 2006). La souche utilisée au laboratoire a été rapportée de Côte d'Ivoire en 2000.

Le mâle se distingue de la femelle d'une part de par sa taille (1,5 à 2 mm pour le mâle contre 2 à 2,5mm pour la femelle) et d'autre part par l'absence de pigmentation sur la partie antérieur de l'abdomen. La femelle est quant à elle d'une couleur noire unie.

Comportement de ponte



Figure 9 Femelles *Anisopteromalus calandrae* pondant sur une graine de Niébé contenant des larves de bruches *Callosobruchus maculatus.*

A. calandrae est un ectoparasitoïde idiobionte[3] solitaire. Lorsqu'une femelle explore un patch de ponte, elle tapote ses antennes sur la surface des graines afin de localiser précisément un hôte potentiel (préférentiellement des larves de stade L_4) grâce au marquage laissé par la femelle Coléoptère au moment de la ponte (Onodera et al., 2002). Une fois l'hôte repéré, elle courbe son abdomen perpendiculairement à la graine de manière à positionner son ovipositeur qu'elle introduit ensuite dans la loge nymphale (**Figure 9**). Elle pique alors l'hôte de l'extrémité de son ovipositeur et injecte un venin qui le paralyse et stoppe son développement. Elle retire ensuite son ovipositeur et peut ainsi déposer un œuf à sa surface avant de ressortir l'ovipositeur de la graine (**Figure 10**).

Développement

Dans nos conditions d'élevage (12 h de jour à 30 °C, 12 h de nuit à 22 °C, et 70% d'humidité), l'œuf éclos entre 30 et 31 heures après la ponte. La larve de premier stade est mobile et se déplace à la surface de l'hôte à la recherche de larves compétitrices ou d'œufs d'autres parasitoïdes. Lorsque celle-ci rencontre un œuf, elle le détruit à l'aide de ses mandibules. Lorsqu'elle est confrontée à un compétiteur, il s'ensuit alors un combat conduisant à la mort d'une des deux larves. La larve se fixe ensuite à l'hôte et en consomme les tissus et l'hémolymphe jusqu'au huitième jour suivant l'éclosion où elle entre alors en nymphose (**Figure 10**). A ce stade, elle n'est plus fixée à l'hôte. Au jour 10 le parasitoïde commence à se colorer, tout d'abord à partir des yeux, puis la tête, le thorax et l'abdomen à partir du jour 13. Il est alors possible de différentier les mâles des femelles, ces dernières

[3] Le terme d'idiobionte se réfère aux parasitoïdes qui stoppent le développement de leurs hôtes, par opposition aux espèces koinobiontes chez lesquelles l'hôte continue de se développer après le parasitisme.

arborant déjà une couleur noire unie. *A. calandrae* est une espèce protandre : les mâles émergent plus tôt que les femelles. En effet, les mâles émergent après seulement 14,3 jours alors que les femelles n'émergent qu'après 15,9 jours en moyenne (Do Thi Khanh, 2005).

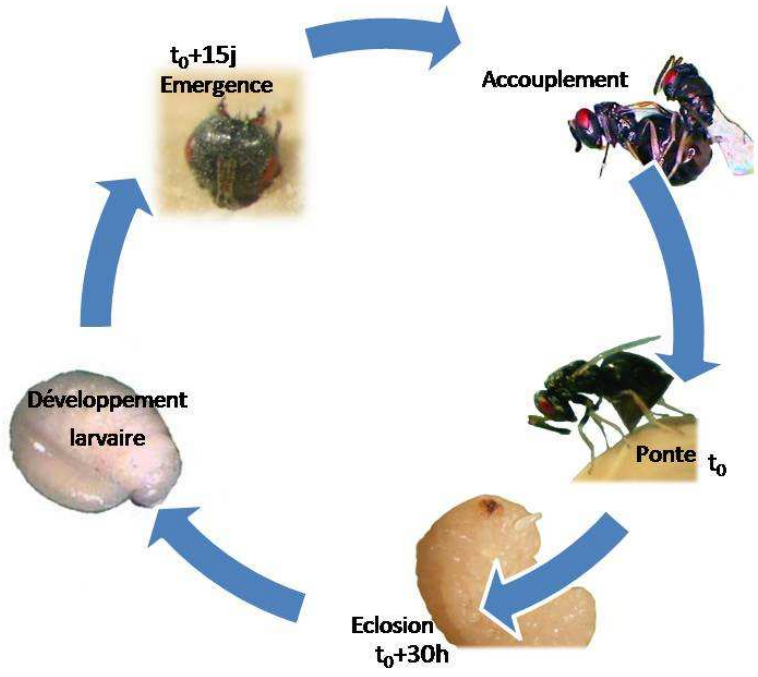

Figure 10 Cycle de reproduction du parasitoïde *Anisopteromalus calandrae*. Après l'accouplement la femelle cherche un hôte (larve de bruche) afin d'y pondre un œuf. Suite à l'éclosion, la larve issue de cet œuf se développe aux dépens de l'hôte en se nourrissant de ses tissus jusqu'à l'émergence de l'adulte.

Les outils expérimentaux

Le marqueur phénotypique

Deux souches du parasitoïde *Anisopteromalus calandrae* ont été isolées au laboratoire. Elles diffèrent par la couleur des yeux (**Figure 11**). La première est une lignée sauvage aux yeux noirs (notée B pour black) et la seconde est une lignée mutante aux yeux rouges (notée R).

Malgré certaines différences entre ces deux lignées, comme le stock spermatique des mâles (Do Thi Khanh et al., 2005) ou leur agressivité face à un compétiteur pour l'accès à une femelle (Do Thi Khanh, 2005), aucune différence n'a jusqu'ici été relevée concernant le comportement de ponte des femelles (Darrouzet, données non publiées).

L'utilisation de femelles homozygotes de ces deux lignées peut ainsi nous permettre par exemple le suivi de la descendance d'une femelle donnée lorsque plusieurs femelles pondent simultanément ou successivement sur le même patch de ponte. Elle peut également permettre de suivre l'issue de combats larvaires entre différents individus pondus sur un même hôte. Ce marqueur phénotypique sera utilisé tout au long de ce travail de thèse pour analyser ces deux types de compétitions (compétition pour l'accès à une ressource de ponte et compétition larvaire).



Figure 11 Les deux lignées d'*Anisopteromalus calandrae* présentes au laboratoire : la lignée sauvage aux yeux noirs (à gauche) et la lignée mutante aux yeux rouges (à droite).

Le système de graines artificielles



Figure 12 Femelle *A. calandrae* pondant sur une graine artificielle dans laquelle a été placée une larve de bruche *C. maculatus.*

Afin d'obtenir des œufs de parasitoïdes et effectuer les expériences comportementales, nous avons utilisé un système de graines artificielles. Ce système est composé d'une gélule en gélatine transparente dont le corps est enfoncé à l'aide d'un piston de manière à accueillir une larve de bruche et recouverte du capuchon mimant ainsi la loge nymphale d'une bruche à l'intérieur d'une graine (Gauthier & Monge, 1999; Darrouzet et al., 2003). Le capuchon est percé de cinq trous répartis autour de la gélule, facilitant ainsi les

échanges gazeux entre l'intérieur de la graine artificielle et le milieu extérieur. Ces trous permettent également au parasitoïde d'introduire plus facilement son ovipositeur dans la gélule afin de pondre (**Figure 12**).

L'un des avantages d'un tel système réside dans la transparence des gélules qui nous permet de voir rapidement si une larve a été parasitée ou pas. Ainsi, une larve parasitée peut ensuite être réutilisée pour un test comportemental, ce qui n'aurait pas pu être possible avec une graine naturelle. En effet, le seul moyen de s'assurer du succès du parasitisme dans ce dernier cas serait d'ouvrir la graine qui ne pourrait, par conséquent, plus être utilisée. L'autre intérêt de ce système est de pouvoir retirer ou échanger certaines parties du système gélule-hôte-œuf sans affecter l'intégrité du système. Ceci permet de pouvoir retirer les œufs surnuméraires présents dans les gélules tout en laissant l'hôte et la graine intacts, ou bien encore de disposer de chaque partie du système indépendamment les unes des autres lors de tests comportementaux afin de déterminer l'importance relative de chacune de ces parties dans les comportements observés chez les parasitoïdes.

Ce système est d'autant plus intéressant qu'il n'affecte pas le comportement de ponte des parasitoïdes (Gauthier, 1996; Gauthier & Monge, 1999).

- DEUXIEME PARTIE -

Compromis entre reproduction immédiate et reproduction future dans un contexte de compétition

Contexte de l'étude

Pour une femelle parasitoïde, un hôte peut aussi bien représenter une source de nourriture qu'une ressource de ponte. Par conséquent, lorsqu'une femelle se trouve confrontée à un hôte, elle a le choix entre pondre un œuf et ainsi investir dans la reproduction immédiate, se nourrir et investir dans la reproduction future ou bien les deux. Les parasitoïdes sont donc un modèle de choix pour l'étude des compromis entre reproduction immédiate et reproduction future. Si l'influence de l'état physiologique des femelles sur ce compromis est relativement bien étudiée et connue, tant d'un point de vue théorique qu'expérimental, l'impact de la qualité des hôtes l'est beaucoup moins. En 2004, Burger et al. ont montré chez *Anisopteromalus calandrae*, que les femelles choisissent préférentiellement des hôtes de grande taille pour pondre (ils sont considérés comme étant de bonne qualité pour le développement des larves) et des hôtes de petite taille pour se nourrir (ils seraient donc de moins bonne qualité). Un autre facteur impliqué dans la qualité d'un hôte est son statut parasité ou non. En effet, lorsque plusieurs individus sont pondus sur un même hôte, ils vont entrer en compétition. Cette compétition est d'autant plus importante chez les espèces solitaires, qu'elle s'exprime par des combats mortels entre les différentes larves. Ainsi, un hôte déjà parasité peut être considéré comme de faible qualité pour la ponte comparé à un hôte non parasité. D'un autre côté, hôtes parasités et non parasités n'apporteront pas forcément la même qualité de ressource nutritive. En effet, lors de la ponte, une femelle parasitoïde injecte généralement un venin. Ce venin peut engendrer différentes modifications physiologiques chez l'hôte, comme la paralysie de celui-ci ou bien des modifications de la composition de son hémolymphe. On observe parfois une augmentation de la concentration en lipides dans l'hémolymphe des hôtes après parasitisme (Rivers & Denlinger, 1995). Par conséquent, il est possible qu'un hôte parasité apporte plus de nutriments à une femelle qui lui ponctionne de l'hémolymphe.

Dans cette partie, nous allons étudier l'influence du compromis entre reproductions immédiate et future sur la sélection d'hôtes parasités ou non parasités. Nous étudierons également comment l'état physiologique des femelles peut moduler ce choix (Article 1).

Article 1

Could hosts considered as low quality for egg-laying be considered as high quality for host-feeding?

Lebreton, S., Darrouzet, E., & Chevrier, C. (2009)
Journal of Insect Physiology, 55: 694-699

Abstract

When parasitoid females encounter a host, they can either lay an egg and thus invest in current reproduction or feed on the host and thus invest in future reproduction. However, hosts could have different values according to their parasitized status. Whereas already parasitized hosts represent poor quality for egg-laying, they could have a high nutritive value for feeding. Moreover, the optimal strategy adopted generally depends on the females' physiological state. In this study, the impact of the females' physiological state on their reproductive strategies was investigated in the solitary parasitoid *Anisopteromalus calandrae*. We analysed how their age and diet influenced (i) the use of hosts (feeding vs oviposition), and (ii) host selection (previously parasitized vs. unparasitized). Our results show that both age and diet influence the reproductive strategy of *A. calandrae* females: old females fed with the poorer diet laid fewer eggs and made more host-feeding than others. Females also showed a preference for already parasitized hosts for feeding. This strategy cannot be explained by the nutritive value of haemolymph, as parasitized hosts carry fewer lipids. However, as parasitized hosts are also paralyzed, it could be less costly to feed on them than on unparasitized hosts.

Introduction

In order to maximize lifetime reproductive success, females constantly need to balance their investment between laying eggs, i.e. in current reproduction, and searching for food, i.e. in future reproduction. In some cases, the same resource can have a reproductive and a nutritive value. Parasitoid females lay their eggs in or on hosts, and after hatching, larvae develop at the expense of hosts. Adult females can also feed directly on hosts by puncturing and consuming host haemolymph through a feeding tube (Giron et al., 2002). Feeding tubes are made by parasitoid females with secretion from their ovipositor inserted into the host (Fulton, 1933). A clear fluid flows from the ovipositor and congeals around it to form the feeding tube (Pupedis, 1978). The females then turn and use the feeding tube to extract the host haemolymph with their mouthpart (Giron et al., 2002). Depending on whether the host is used for feeding or for oviposition, parasitoid females obtain an immediate or a potential future fitness benefit.

Host-feeding could provide adult females with nutritional resources to increase their life expectancy (Giron et al., 2002), egg maturation (Phillips, 1993; Ueno, 1999b; Burger et al., 2005; Rivero & West, 2005; Ferracini et al., 2006), or both (Collier, 1995; Heimpel et al.,

1997; Giron et al., 2004). Host-feeding can be classified into different types: concurrent (when both host-feeding and oviposition occur on the same host), non-concurrent, destructive (when host-feeding kills the host and thus makes the host unsuitable for parasitoid development), and non-destructive (Jervis & Kidd, 1986; Krivan, 1997). Non-concurrent/destructive and concurrent/non-destructive have been shown to be the feeding patterns which maximize parasitoid fitness (Krivan, 1997) and to be the most common in parasitoid species (Jervis & Kidd, 1986).

An important feature of the trade-off between current and future reproduction is the quality of hosts encountered by females. They prefer to feed on hosts of poor quality for larval development, while saving hosts of higher quality for oviposition and offspring development (Burger et al., 2004). *Anisopteromalus calandrae* females tend to choose large hosts for oviposition and small hosts for feeding (Choi et al., 2001). Another host quality predictor is the parasitized status of the host, already parasitized hosts usually being considered as lower quality for oviposition than unparasitized ones (Godfray, 1994). In solitary species, only one adult can emerge from a given host, whatever the number of eggs laid, due to lethal larval fights (Ueno, 1997; van Baaren et al., 1999). Thus, by laying an egg on a parasitized host, females reduce the survival rate of their progeny (Lebreton et al., 2009b). However, already parasitized hosts could be more profitable for feeding. In idiobiont species of pupal and larval parasitoids, females inject venom into the host before ovipositing or feeding, inducing the paralysis of the host and arresting its growth (Mackauer & Sequeira, 1993). Feeding on these paralyzed hosts could be advantageous for females because less time and energy are required. Moreover, the venom could induce changes in the haemolymph composition of the hosts (Cox, 1970), such as an increase in the amount of haemolymph lipids (Cox, 1970; Rivers & Denlinger, 1995; Nakamatsu & Tanaka, 2003). Feeding on already parasitized hosts could thus provide the females with an additional supply of nutrients. This aspect has never been investigated in studies dealing with the trade-off between current and future reproduction.

However, several recent theoretical studies have investigated this trade-off (Collier et al., 1994; Heimpel et al., 1994; Sirot & Bernstein, 1996; Sirot & Bernstein, 1997; Burger et al., 2004). Overall, they indicate that the optimal strategies depend on both the physiological state of female parasitoids and host availability. According to this theory, female parasitoids give preference to host-feeding when they are young, when their egg load and their nutritional state are low and host availability is high (Heimpel et al., 1994). These theoretical models have been supported by experimental studies. For example, females of the parasitoid *Aphytis melinus* invest more in host-feeding than in oviposition when they have lower egg load and

fewer nutritional reserves (Heimpel & Rosenheim, 1995). While the value allocated to hosts by parasitoid females depends on their strategy (feeding or egg-laying), host selection could be influenced by the females' physiological state.

The main purpose of this study was to investigate the trade-off between current and future reproduction in the solitary ectoparasitoid *Anisopteromalus calandrae* Howard (Hymenoptera, Chalcidoidea, Pteromalidae). We investigated whether females' reproductive strategies (oviposition or feeding) were influenced by the host's parasitized status (parasitized or unparasitized) and/or by their physiological state (age and diet). The cost and benefits of feeding according to host status are then discussed, in relation to the amount of nutrients available in host haemolymph.

Materials and methods

Rearing conditions

Anisopteromalus calandrae is a parasitoid of the larvae and pupae of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchidae) from the tropical zones of West Africa. Both *C. maculatus* and *A. calandrae* originated from Ivory Coast (collected in 2000) and were reared in the laboratory under conditions close to their area of origin: 12 h light at 30°C, 12 h dark at 22°C, and 71% r.h.

General methods

Anisopteromalus calandrae females were allowed to lay on an artificial seed system composed of gelatine capsules (Gauthier & Monge, 1999; Darrouzet et al., 2003). The bruchid L4 larvae were placed inside the capsules after removal from seeds by dissection. The size of larvae was homogenized to avoid a bias in the females' strategy due to this factor. The gelatine capsules mimic the bruchid pupal chamber in the seed and are accepted for oviposition by females. To obtain parasitized hosts, five gelatine capsules each containing one *C. maculatus* L4 larva were offered to a group of ten virgin *A. calandrae* females confined to an arena (2.5 cm high × 8 cm in diameter). Hymenoptera parasitoids reproduce by arrhenotokous parthenogenesis, whereby fertilized (diploid) eggs develop into females and unfertilized (haploid) eggs into males. Thus, by using virgin females, only male eggs were obtained, thereby preventing a bias due to the sex of eggs presented to the females. The injection of *A. calandrae* venom induces the paralysis of *C. maculatus* larvae (Lebreton, personal observations). To ensure that females injected venom during oviposition, the

paralyzed status of the parasitized hosts was controlled. These hosts were then used in choice tests. The survival rate of an egg laid on an already parasitized host decreases sharply with the time after the first parasitism event (Lebreton et al., 2009b). In order to avoid a bias due to these survival probability differences, hosts were only offered for two hours after oviposition; the survival rate of the second egg laid remains stable at about 50% during this time interval (Lebreton et al., 2009b).

Preparation of experimental females

To investigate the influence of the physiological state of mated females on their reproductive strategies, we looked at parameters of both age and nutritional state. Mated females were obtained by placing a 2-hour-old virgin female with a 24-hour-old virgin male in a Petri dish. Mating was confirmed by direct observation. Two age categories (3 days and 15 days old) of females were investigated. Under our laboratory conditions, less than 25% of females remain alive after 23 days (Do Thi Khanh et al., 2005); 15-day-old females could therefore be considered as old. Furthermore, *A. calandrae* is a synovigenic species, i.e. females emerge without mature eggs; the experiment therefore took place after three days to ensure that the young females were bearing mature eggs. These two categories of age were thus selected to compare the reproductive strategy of young and old females. Before the experiments, all the females were fed with a solution of sucrose replaced every two days. Three days before the beginning of the experiment one group of females in each age category was allowed to feed on *C. maculatus* larvae. In order to avoid a bias due to previous oviposition experience, the larvae offered to females were first removed from their seed, preventing the females from laying eggs on them, without stopping them from feeding (Lebreton, personal observation).

Impact of age and diet on reproductive strategies and host selection

Females of each category (3 days old (3d; n=56), 3 days old allowed to feed on host (3d-fed; n=56), 15 days old (15d; n=75), and 15 days old allowed to feed on host (15d-fed; n=53)) were then given a host choice test consisting of two capsules, one containing an unparasitized host, the other containing a previously parasitized host. Choice tests took place in a climatic chamber (22°C, 71% r.h.), and all the behavioural sequences were observed. The selected host, the strategy employed by females (feeding and/or oviposition) and the time taken were noted. The test ended as soon as females left the selected capsule, with a maximum time limit of two hours. The proportion of active females (females which host-fed and/or oviposited) was then calculated. To check the impact of host-feeding on egg survival, each egg laid on an

unparasitized host was deposited with its associated host in a separate cell in a Plexiglas sheet until emergence of parasitoid adults (Darrouzet et al., 2003). After emergence, the proportion of eggs laid after host-feeding and which reached the adult stage was compared to those of eggs laid without host-feeding. The strategy employed by females (host-feeding and/or oviposition) and the mortality of eggs developed on hosts used for host-feeding allowed us to determine the host-feeding pattern (concurrent or not, and destructive or not) used by *A. calandrae* females. To analyse the consequences of age and diet on the viability of the eggs, the proportion of offspring laid by females (3d, n=34; 3d-fed, n=21; 15d, n=30 and 15d-fed, n=34) reaching adulthood was calculated and compared.

Impact of age and diet on egg maturation and resorption

To analyse the impact of both age and diet on egg maturation and resorption, random females of each category (3d, n=9; 3d-fed, n=9; 15d, n=13 and 15d-fed, n=12) were dissected in a drop of saline solution (128.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.3 mM $CaCl_2$), and the number of mature eggs was recorded.

Analysis of the haemolymph of parasitized and unparasitized hosts

Haemolymph was extracted from unparasitized and parasitized hosts two hours after parasitism. Extractions were carried out by inserting a microcapillary connected to a manual pump in the mid-lateral side of their body (Giron et al., 2002). The fluids collected (ca 0.5 µl) were immediately pumped out in a 0.5 ml Eppendorf tube placed on ice. Haemolymph of 10 hosts of the same status were pooled in the same tube in order to obtain a sufficient quantity of fluids, and the tube was then frozen at -20°C.

To quantify the amount of proteins, the Bradford dye-binding microassay (Bradford, 1976) procedure was used. For each sample (n=9 for both parasitized and unparasitized hosts), 1µl was added to 500 µl of a solution containing Bradford Reagent (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Each Sample was left to react for 5 min at room temperature and then transferred to a microcuvette and read in a spectrophotometer at 595 nm. For the sugar analysis, 1µl of each sample (n=8 for parasitized hosts and n=10 for unparasitized hosts) was added to 1ml of a solution of anthrone reagent. The whole solution was then heated at 90°C for 10 min, placed at room temperature for 5 min and read in a spectrophotometer at 625 nm. The amount of lipids was analysed using a sulfo-phospho-vanillin reaction (Van Handel, 1985). First, 1µl of each sample (n=9 for parasitized hosts and n=11 for unparasitized hosts) was completely evaporated at 90°C. Next, 40 µl of sulphuric

acid was added and samples were heated at 90°C for 10 min. After 5 min at room temperature, 960µl of a solution of vanillin reagent was added, samples were left to react for 10 min at room temperature and then read at 525 nm.

Calibration curves were obtained using bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich) for protein analysis, glucose for sugar analysis, and a standard vegetable oil for lipid analysis.

Statistical analysis

To analyse female activities and both host selection and the strategies used among these hosts, a χ^2-test was performed. A χ^2-test was also used to analyse egg survival. We used Student's *t*-tests to compare (1) the time needed to feed and/or lay eggs on parasitized and unparasitized hosts, and (2) the hosts' haemolymph composition. To analyse the number of mature eggs in the ovaries, only females of the same age or diet needed to be compared, and therefore, rather than a global test we used a non-parametric Mann-Whitney U-test with a Bonferroni correction method (threshold level of $P<0.0125$). For all other tests, a threshold level of $P<0.05$ was used. Analyses were carried out with R software (R 2.1.1, R Development Core Team, Free Software Foundation Boston, MA, USA).

Results

Impact of age and diet on reproductive strategies and host selection

When *A. calandrae* females fed on *C. maculatus* larvae before the host-choice test (3d-fed and 15d-fed), they were less active during the test than the other groups (**Figure 13A**; $\chi^2 = 22.72$, d.f. = 1, $P<0.001$). Fewer eggs were laid and more host-feeding observed with active 15d than 15d-fed ($\chi^2 = 19.22$, d.f. = 3, $P<0.001$) and 3d females ($\chi^2 = 13.80$, d.f. = 3, $P = 0.003$). At the same time, the same number of eggs were laid and similar host-feeding was carried out by active 3d as 3d-fed females ($\chi^2 = 1.65$, d.f. = 3, $P = 0.65$) and by 15d-fed as 3d-fed ($\chi^2 = 2.56$, d.f. = 3, $P = 0.46$). Age and diet also had an effect on host selection and on how strategies were allocated among these hosts ($\chi^2 = 47.06$, d.f. = 15, $P<0.001$), but there was no effect of age on these factors when females fed on larvae before the tests (3d-fed and 15d-fed) (**Figure 13B**; Fisher test, $P = 0.53$).When looking at females irrespective of categories, sixty percent of active females made a feeding tube and then laid an egg on the same host, with no difference between parasitized and unparasitized hosts (58.3% vs 67.6%, $\chi^2 = 0.84$, d.f. = 1, $P = 0.36$).

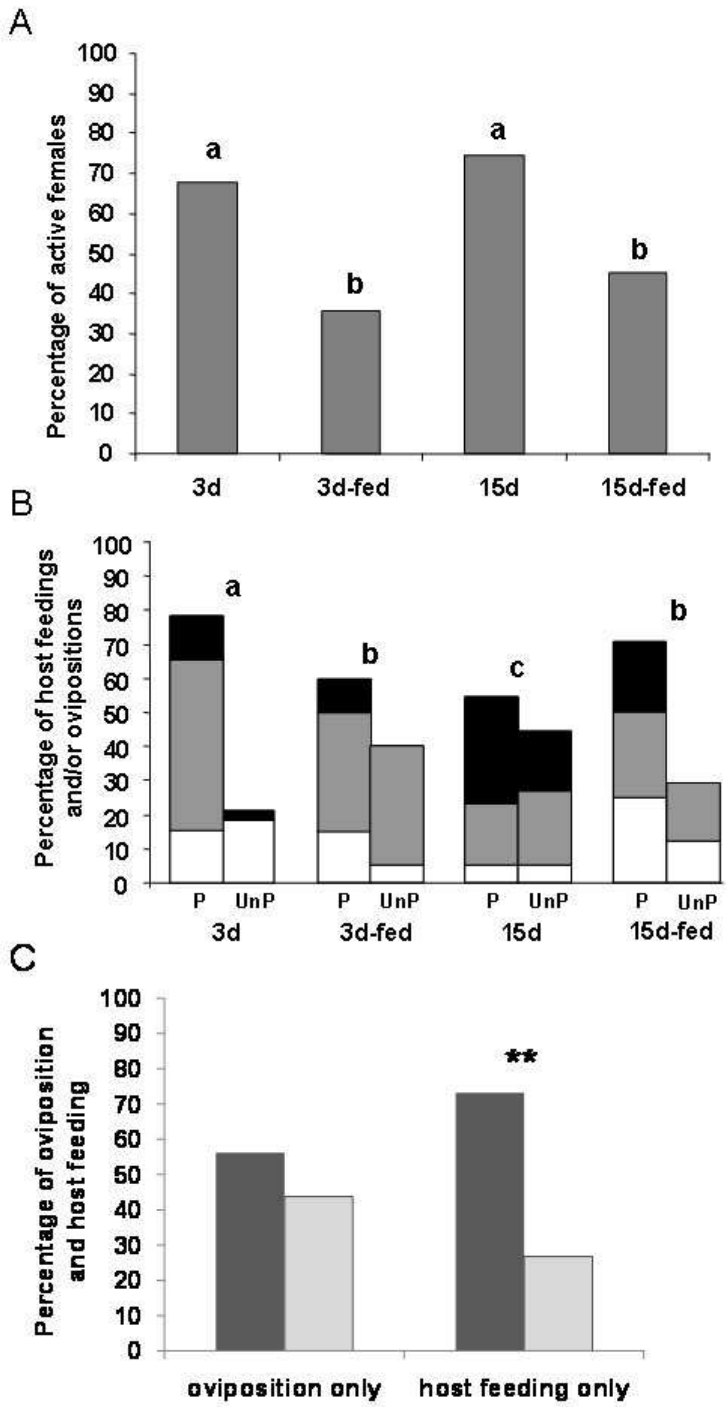

Figure 13 Activity and strategy of females during the choice test. (A) Percentage of active females during the test (females who selected a host for feeding and/or egg-laying) in each category: 3-day-old females with (3d-fed) or without (3d) access to hosts before the test, and 15-day-old females with (15d-fed) or without (15d) access to hosts. (B) Reproductive strategies of active females (oviposition in white, host-feeding in black, or both in grey) on each category of host (parasitized: P, or unparasitized: UnP) for each category of females. Statistical tests (χ^2-test) compare the global distribution of the three possible strategies on parasitized and unparasitized hosts between female categories. Statistical differences between female categories are shown by different letters (a, b, c). (C) Percentage of active females which performed oviposition only or host-feeding only on unparasitized (light grey) or parasitized (dark grey) hosts irrespective of their physiological state. ** $P<0.01$ (χ^2-test).

Moreover, they fed more on already parasitized than unparasitized hosts (**Figure 13C**; χ^2 = 8.80, d.f. = 1, P = 0.003), but the oviposition rate was the same on the two host categories (**Figure 13C**; χ^2 = 0.5, d.f. = 1, P = 0.48). Most previously parasitized hosts were paralyzed during the first parasitism (92% of parasitized hosts). The same time was needed for a female to perform host-feeding and oviposition on an unparasitized (67.8 ± 5.3 min) and an already parasitized host (71.2 ± 3.4 min; t = 0.56, d.f. = 60, P = 0.58). Moreover, there was no difference in the time needed only to host feed (76.4 ± 6.4 min) and that needed to feed and oviposit (70.1 ± 2.8 min; t = 0.99, d.f. = 76, P = 0.33). There was no difference between the survival rate of eggs laid after host-feeding (87.5%) and those laid without host-feeding (88.2%; Fisher test, P = 1.0). Neither age nor diet had an effect on the survival rate of the eggs produced (3d: 83%, 3d-fed: 67%, 15d: 80%, 86%; χ^2 = 3.02, d.f. = 3, P = 0.39).

Impact of age and diet on egg maturation and resorption

The quantity of mature eggs was affected by both diet and age. For the same age category, 3d and 15d females carried fewer mature eggs than 3d-fed (U = 8.5, P = 0.003) and 15d-fed females (U = 23, P<0.001; **Figure 14**). For the same diet, 15-day-old females carried fewer mature eggs than 3-day-old females (unfed: U = 20.5, P = 0.009; fed: U = 0.5, P<0.001).

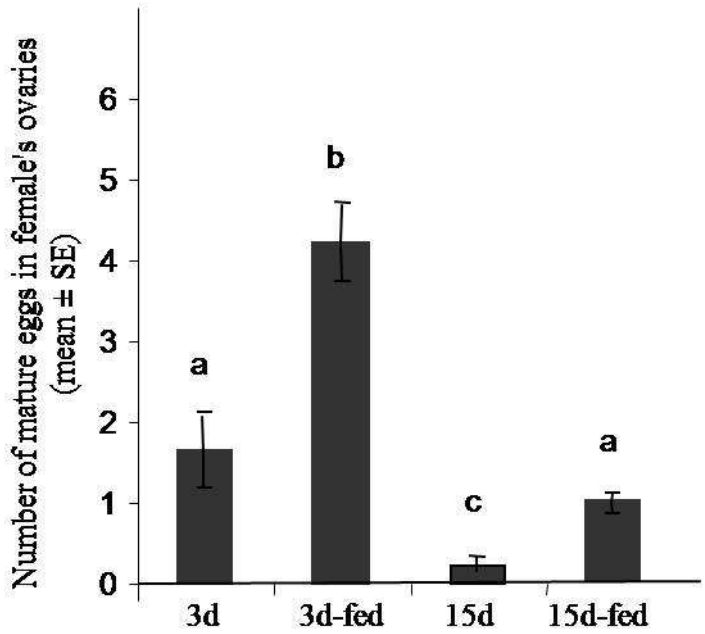

Figure 14 Number of mature eggs (mean ± SE) carried by 3-day-old and 15-day-old females with both diet treatments before the choice test. Statistical differences (Mann-Whitney U-test) are shown by different letters (a, b, c).

Analyses of the haemolymph of parasitized and unparasitized hosts

Haemolymph from unparasitized and 2-hour-parasitized hosts did not differ in the amount of sugar (t = 0.66.0, d.f. = 15, P = 0.52) and protein (t = 1.17, d.f. = 16, P = 0.26) (Fig. 3), but the haemolymph of parasitized hosts carried fewer lipids than those of unparasitized hosts (t = 2.90, d.f. = 18, P = 0.009; **Figure 15**).

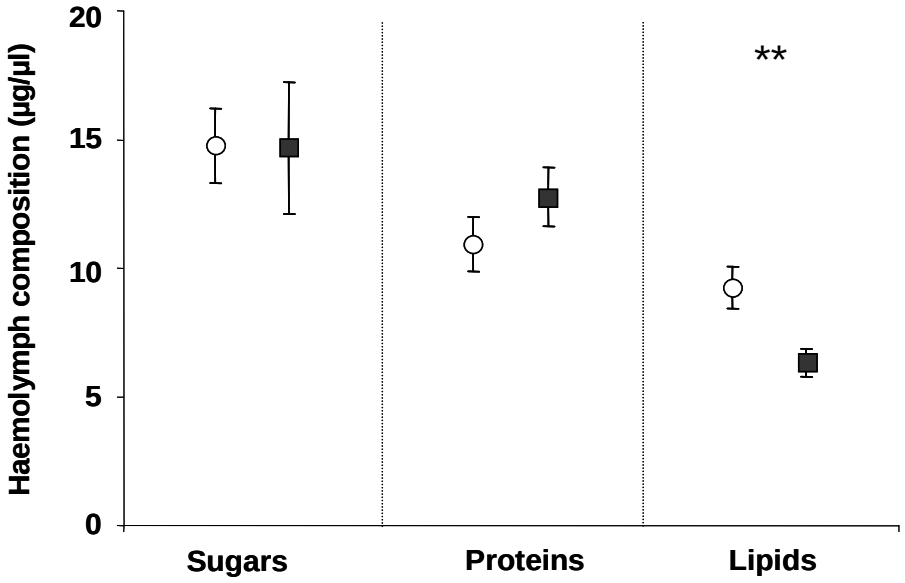

Figure 15 Amount of sugars, proteins and lipids (mean ± SE) in haemolymph of unparasitized (○) and 2-hour-parasitized hosts (■). ** P<0.01 (Student *t*-tests).

Discussion

Our results demonstrate that the trade-off between current and future reproduction in *Anisopteromalus calandrae* females is strongly influenced by their physiological state (age and diet). Diet influenced their activity: when females had access to hosts in order to feed prior to the experiment, the probability of selecting a host during the choice test decreased. In fact, these females were less active during the choice tests, i.e. a higher proportion selected no host. This could be explained by a decrease in the proportion of females actively searching a host to feed on to increase their nutritional reserves. A theoretical study has suggested that when the survival rate is high (i.e. when energy reserves are high) females will be more selective towards the hosts they encounter at the expense of current reproduction (Sirot et al., 1997). This observation could also be linked to a satiation factor. Moreover, it is also possible that host pre-exposure itself influences their activity. Under our experimental conditions, as females were confronted with unparasitized and parasitized hosts in the same patch, it is

possible that they waited for unparasitized hosts before ovipositing. This could explain the low activity rate of females with high reserves in our study.

The female's expectancy to feed and/or to oviposit depends on her egg load. Our results show that females who carry the least number of mature eggs in their ovaries invest more in future reproduction by host feeding. This result is in line with previous theoretical (Collier et al., 1994; Heimpel et al., 1994) and experimental studies (Heimpel & Rosenheim, 1995). At the same time, when they have eggs in their ovaries, females keep the same host-feeding rate whatever their diet, suggesting that the number of eggs is not important in the host-feeding rate as long as they do have eggs. This is supported by theoretical models which predict that if mortality is dependent on nutritional state, animals will tend to maintain high energy reserves (Sirot & Bernstein, 1996). This prediction supports our results which show that the majority of females who laid eggs first fed on the host. This strategy seems to be adaptive, particularly as prior host-feeding did not influence the survival rate of an egg laid on the same host. *Anisopteromalus calandrae* females therefore perform a concurrent and non-destructive pattern of behaviour, one of the two patterns which maximize their fitness.

Haemolymph consumption provides females with nutrients that could increase egg production (Phillips, 1993; Collier, 1995; Ueno, 1999b; Rivero et al., 2001). Our results indicate that when females have access to hosts for feeding, they increase their egg load. Although haemolymph consumption is probably the main factor involved in egg production, it is possible that host exposure alone can increase egg maturation (Casas et al., 2009). When females were deprived of hosts, they resorbed their mature eggs. Egg resorption could provide them with nutritional reserves for their survival (Rosenheim et al., 2000; Santolamazza Carbone et al., 2008). In this way, they increase their life expectancy and thus the probability of encountering hosts again (Rosenheim et al., 2000). Moreover, when females were allowed to feed on hosts for three days, old females (15 days old) increased their egg load by just one egg, whereas the egg load of young females (3 days old) increased by more than 2.5 eggs. This result suggests that egg maturation is impaired in old females. This hypothesis is in line with the study of Hegazi et al. (2007) who observed that the fecundity of females decreased with age when they were host-deprived for a long time. While parasitoid females have been shown to reduce their investment in egg quality with age (Giron & Casas, 2003), in our study neither age nor diet affected egg viability.

Physiological state also influences host selection and the strategy employed towards these hosts. However, when females had access to a richer diet, they allocated their strategy among hosts similarly, whatever their age. This result suggests that, among other

physiological factors, nutritive reserves could play an important role in this trade-off and host selection. However, by being exposed to hosts, these females are no longer naïve, and this exposure could also be an explanation of the strategy allocation observed. In fact, prior experience has already been shown to influence host selection in *A. calandrae* (Ghimire & Phillips, 2008). When looking at females irrespective of physiological state, under our experimental conditions they selected as many unparasitized as parasitized hosts for reproduction only, whereas for feeding they selected more hosts which had been parasitized for 2 hours. A number of studies have observed that host haemolymph composition is modified after parasitism. These studies often observed an increase in the amount of lipids in the haemolymph (Rivers & Denlinger, 1995; Nakamatsu & Tanaka, 2003), probably due to the lysis of host fat body by the venom components (Nakamatsu & Tanaka, 2004). However the venom composition of most parasitoid species and their action on host metabolism remains unknown (Quicke, 1997; Moreau & Guillot, 2005). In our study, fewer total lipids were carried by parasitized than unparasitized hosts in their haemolymph. Lipids are important in egg maturation (Giron et al., 2004; Casas et al., 2005) or viability (Mondy et al., 2006). However, in the parasitoid wasp *Eupelmus vuilletti*, females acquire most lipids during their larval stages (Casas et al., 2005). In this case, the smaller gain of lipids generated by feeding on already parasitized hosts probably has a low impact on the females' fertility and longevity. Furthermore, modifications in the host's lipid metabolism after venom injection could vary among host species. For example, the *Nasonia vitripennis* venom induces an increase in lipids in the haemolymph of three host species, but a decrease in a fourth (Rivers & Denlinger, 1995). *A. calandrae* is a generalist parasitoid and it is therefore possible that its venom induces an increase in the amount of haemolymph lipid in the majority of its natural hosts, in contrast to our findings in *C. maculatus*. Moreover, the selection of parasitized hosts for feeding could be explained by the higher cost of making a feeding tube on an unparasitized host; feeding tubes are very brittle, and if hosts are not totally paralyzed before females feed, only a small movement by the host will break them (Lebreton, personal observation). Females thus have to paralyse the host before making the feeding tube. The paralysis is likely to be energy-costly for a female: she has to invest in venom production, host stinging and venom injection. Feeding on parasitized hosts, i.e. already paralyzed hosts, thus avoids this energy investment. Further studies are however required to determine precisely the cost of venom production and injection. Nevertheless, paralysing a host is not time-costly for an *A. calandrae* female, because there is little difference in the time taken to feed on unparasitized and already parasitized hosts.

The time spent on the host does not vary whether females feed and lay an egg or whether they only feed on the host, whatever the parasitized status of the host. Thus, under our experimental conditions, many females laid an egg after feeding, even on already parasitized hosts. However, in solitary species, the survival rate of an egg laid under superparasitism conditions (on an already parasitized host) is reduced (Lebreton et al., 2009b). How could this strategy be advantageous for females? Under our conditions, hosts were parasitized two hours before the experiment. In this case, an egg laid under superparasitism conditions has about a 50% chance of survival (Lebreton et al., 2009b), which is not negligible. We saw that females did not invest more time in laying an egg after feeding, and they could thus optimize the time invested in feeding by laying an egg. This strategy would be optimal if females were more time- than egg-limited. Actually, *A. Calandrae* females are synovigenic, and our data show that they have only a few mature eggs at any given moment. At the same time, they reproduce on aggregates of hosts, suggesting that under natural conditions, hosts are not a limited resource. This indicates that, in this species, females should be more egg- than time-limited. However, under our experimental conditions, females were allowed to encounter only a few hosts and could be thus considered as time-limited. Moreover, the females in this study had never previously laid eggs. It is possible that they subsequently modified their oviposition strategies according to their nutritional reserves. In fact, when females were confronted with parasitized and unparasitized hosts for one week, they preferentially oviposited on the latter (Lebreton et al., 2009b).

To conclude, the present work highlights the strong link between the trade-off between current and future reproduction, host selection and the females' physiological state (age, diet and egg load) in a solitary parasitoid species. *A. calandrae* females resorb their eggs when they are deprived of hosts for a long time. To allow their eggs to mature, or just to maintain high nutritive reserves, they perform host feeding when they encounter a host again. Females preferentially feed on already parasitized hosts, which possibly avoids them having to invest energy in paralyzing hosts prior to feeding. This indicates that the quality allocated by parasitoids to hosts depends on the strategy employed; hosts considered as having low reproductive qualities do not necessarily have low nutritive values.

Acknowledgments

We would like to thank J. Casas, D. Giron and two anonymous reviewers for providing useful comments on the manuscript and E. Yates for correcting the English.

Conclusion de la partie

Nous avons pu mettre en évidence dans cette étude que la sélection de l'hôte est déterminée par le besoin de la femelle : pondre ou s'alimenter. Cette stratégie dépend en plus de l'état physiologique de la femelle. Ainsi, les femelles parasitoïdes font préférentiellement des tubes alimentaires sur les hôtes déjà parasités. Cependant, contrairement à nos hypothèses, elles ne pondent pas plus sur des hôtes non parasités. Les femelles utilisées dans cette étude n'ont jamais eu l'occasion de pondre auparavant, et elles ne sont autorisées à pondre qu'un seul œuf. Il est possible que si elles n'étaient pas limitées en hôtes, elles choisiraient par la suite préférentiellement les hôtes non parasités pour déposer leurs œufs. Ce point reste à être testé.

Un résultat non présenté dans l'étude nous laisse penser que la perception de stimuli (composés volatils) à distance serait altérée chez les femelles âgées. En effet, les femelles de 3 jours distinguent à distance le statut parasité de l'hôte en se dirigeant principalement en premier vers les hôtes parasités. Les femelles de 15 jours, quant à elles, se dirigent indifféremment vers les deux types d'hôtes ; et ceci, quel que soit leur régime alimentaire. Pourtant, quand elles sont posées sur la graine, ces femelles sont bien capables de discriminer les deux types d'hôtes, comme le montrent nos résultats. Il serait alors intéressant d'étudier si cette altération est due à une baisse de sensibilité des récepteurs antennaires avec l'âge ou plutôt à une modulation au niveau du système nerveux central.

Nous avons vu également que le choix de faire des tubes alimentaires sur des hôtes déjà parasités ne pouvait pas s'expliquer par la qualité nutritive de ces hôtes. En effet, leur hémolymphe contient moins de lipides que celle des hôtes non parasités et leurs concentrations en protéines et glucides ne changent pas. Ce plus faible apport de lipides des hôtes parasités n'a peut être qu'un faible impact sur les réserves lipidiques de la femelle. D'autant plus que lorsqu'une femelle choisit un hôte non parasité, elle est obligée de le paralyser avant de faire son tube alimentaire et de ponctionner l'hémolymphe. Le venin entraîne rapidement la paralysie de l'hôte (de l'ordre de quelques minutes). Il est par conséquent possible que l'action de venin sur le métabolisme lipidique soit également relativement rapide. D'un autre côté, le temps nécessaire pour une femelle pour faire un tube alimentaire et se nourrir est d'environ 75 min, ce qui est relativement long. Ainsi, il se peut que la quantité de lipides disponible dans l'hémolymphe ait déjà commencé à diminuer lorsque la femelle commence à se nourrir. Dans ce cas, la différence d'apport en lipides entre les deux types d'hôtes serait moins importante que celle observée. La valeur nutritive des hôtes non parasités et parasités pourrait ainsi être relativement proche et les parasitoïdes

auraient tout intérêt à se nourrir sur ces derniers pour ne pas investir d'énergie dans la paralysie. Néanmoins, les parasitoïdes ont tout intérêt à se nourrir sur des hôtes récemment parasités car 48 heures après le premier parasitisme la concentration en lipides continue à chuter (3,78 µg/µL), tout comme la concentration en sucres qui baisse de moitié (passant de 14,68 à 7,83 µg/µL ; données non publiées).

- TROISIEME PARTIE -

Impact des combats larvaires sur les stratégies de ponte des femelles

Contexte de l'étude

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les stratégies employées par les parasitoïdes influencent la sélection de l'hôte. Ainsi, en fonction de leur état physiologique, un certain nombre de femelles choisissent préférentiellement des hôtes déjà parasités (notamment afin de s'y nourrir), mais finissent par pondre dessus. La probabilité de survie de ces œufs est réduite de par la présence de compétiteurs. Cela se traduira par des combats larvaires aboutissant à la mort de toutes les larves sauf une. Cependant, tous les hôtes parasités ne sont pas de qualité égale et la probabilité de survie d'un deuxième œuf pondu peut varier d'un hôte à l'autre. L'intervalle de temps entre les deux pontes ainsi que le sexe des larves sont des paramètres déterminant pour la probabilité de survie du deuxième individu. En effet, on observe généralement une forte diminution de la probabilité qu'une deuxième larve gagne le combat dès lors que l'intervalle de temps entre les deux pontes augmente. Un œuf pondu sur un hôte sur lequel une larve est déjà présente aura par conséquent une probabilité de survie très faible qui pourra parfois avoisiner le zéro. Les heures suivant la première ponte jusqu'à l'éclosion du premier œuf sont donc une période clé pour une femelle choisissant de pondre sur un hôte déjà parasité. Par conséquent, si les femelles parasitoïdes sont capables de déterminer l'intervalle de temps écoulé depuis une première ponte, elles devraient préférentiellement pondre sur les hôtes parasités depuis peu de temps de manière à maximiser les chances de survie de leurs descendants.

Concernant l'impact du sexe des larves, il a déjà été montré dans d'autres études que l'aptitude d'une larve à combattre pouvait dépendre de son sexe (van Baaren et al., 1999). Une femelle parasitoïde pourra donc adapter le sexe des œufs qu'elle pond en fonction de celui qui est le meilleur compétiteur lors des combats larvaires. Mais le sexe des descendants des autres femelles peut également affecter la ponte d'un parasitoïde. En effet, si on se réfère à la théorie de la Local Mate Competition d'Hamilton (1967), une femelle parasitoïde doit ajuster son sex-ratio de ponte lorsqu'elle est en présence de compétitrices en produisant une proportion plus importante de mâles. Ceci dans le but que ses fils soient assez nombreux pour pouvoir inséminer à la fois ces propres filles, mais également celles des autres femelles. Ce modèle peut également s'appliquer dans le cas où une femelle est confrontée à un patch de ponte déjà exploité (compétition par exploitation). Mais dans ce cas, et si la femelle parasitoïde est capable de discriminer le sexe des œufs déjà pondus, elle devrait adapter son sex-ratio de ponte, non pas en fonction du nombre d'œufs présents, mais en fonction du sexe de ces œufs. C'est ce que Hamilton (1967) prédit dans son modèle « Sex Ratio Games ».

Ainsi, chez des espèces solitaires qui se reproduisent sur des agrégats d'hôtes telles qu'*A. calandrae*, ces deux facteurs (asymétrie dans les combats larvaires et Sex Ratio Games) devraient influencer les stratégies de ponte (sélection de l'hôte et adaptation du sex-ratio de ponte) des femelles en situation de compétition intraspécifique par exploitation.

L'objectif de cette troisième partie est, dans un premier temps, d'étudier l'influence de l'intervalle de temps entre deux pontes sur la survie d'un deuxième individu ainsi que l'impact que cela aura sur les stratégies de ponte des parasitoïdes (Article 2). Dans un deuxième temps, nous essaierons de comprendre les mécanismes impliqués dans cette discrimination et notamment d'identifier les signaux perçus par les femelles, leur permettant de distinguer ces différents types d'hôtes (Article 3). Enfin, nous étudierons l'influence du sexe des larves sur leurs aptitudes à combattre. Nous verrons comment ce facteur peut influencer la ponte d'une femelle exploitant un patch d'hôtes déjà parasité et nous discuterons nos résultats par rapport à la théorie du « Sex Ratio Games » (Article 4).

Article 2

Discrimination of the age of conspecific eggs by an ovipositing ectoparasitic wasp

Lebreton, S., Labarussias, M., Chevrier, C. & Darrouzet, E. (2009)
Entomologia Experimentalis et Applicata, 130: 28-34

Abstract

The recognition and avoidance of already parasitized hosts is a major issue in parasitoid behavioural ecology. A key factor affecting the fitness reward expected from superparasitism is the probability that the second or subsequent egg laid on a host will win the contest with the first-laid egg. The present study investigated the ability of females of the solitary parasitoid *Anisopteromalus calandrae* Howard (Hymenoptera: Pteromalidae) to (i) discriminate between unparasitized *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) hosts and those parasitized by a conspecific, and (ii) discriminate between a host parasitized by an egg just laid (2 h) and one parasitized by an egg about to hatch (28 h). Our results show that *A. calandrae* females can discriminate between parasitized and unparasitized hosts, as they lay more eggs on the latter. However, they did not adjust their offspring sex ratio on already parasitized hosts compared to unparasitized one. The probability of the second or subsequent egg laid on a host (superparasitism) winning the contest with a conspecific increases as the time between the two ovipositions decreases. Consequently, parasitoid females should lay more eggs on recently parasitized hosts than on those which have been parasitized for a long time (i.e., when the first eggs are about to hatch), and that is indeed what they were found to do. To increase their fitness in spite of the presence of already parasitized hosts, *A. calandrae* females have developed highly discriminative capacities regarding the parasitism status of hosts; they can recognize whether the hosts have already been parasitized or not, and whether previously laid eggs are fresh or older.

Introduction

Parasitoid females are expected to adapt their oviposition strategies in different ways in order to maximise their reproductive success. For example, they could adjust their offspring sex ratio to environmental factors (Godfray, 1994). One such factor which has been studied in depth is the level of intraspecific competition. According to the Local Mate Competition theory (LMC; Hamilton, 1967), females foraging alone on a patch produce more daughters than sons, while females competing on a given patch adjust their oviposition strategies to an unbiased sex ratio. By depositing more sons, a female increases the chance that her sons will inseminate most of the females in the reproductive patch, including her own daughters and those of other females (King, 2002). While the LMC theory was primarily developed for gregarious species, it can also be applied to solitary species which reproduce on an aggregate of hosts and are thus considered as semi-gregarious (Godfray, 1994). The LMC model can

also be applied to indirect competition, i.e., when an isolated female is confronted with already parasitized hosts (Werren, 1980; Shuker et al., 2006; Darrouzet et al., 2008). In this situation, females adapt their sex ratio as if they are in a direct competition situation, even if they never encounter a conspecific female.

When a female encounters a parasitized host, she can either reject it and continue to search for unparasitized hosts, or accept it and superparasitize that host (i.e., lay an egg on an already parasitized host). Gregarious as well as solitary species can superparasitize hosts, but in solitary parasitoids, the presence of supernumerary juveniles results in a contest competition and the death of all but one immatures. This competition has been defined as lethal larval combats (Ueno, 1997), physiological suppression (Vinson & Hegazi, 1998), or scramble competition (Mayhew & Hardy, 1998). While the expected fitness gain per host is lower when females superparasitize, superparasitism by solitary species can be adaptive under certain conditions (van Alphen & Nell, 1982), for example, when the number of unparasitized hosts is small or when travel time between patches is long (van Alphen & Visser, 1990; Waage, 1986). In fact, this behaviour is adaptive when the second egg laid on an already parasitized host can win the competition with the first immature (van Baaren & Nénon, 1996). In some species, females perform ovicide (i.e., killing the first egg) before ovipositing. In this situation, females restore host quality and the host is once again acceptable for oviposition (Godfray, 1994).

In solitary parasitoids, as females have to optimize their investment in eggs on a given host, they need to be able to assess the quality of that host and the probability of survival of their progeny. Female parasitoids have been shown to discriminate between unparasitized and parasitized hosts in several species (Gauthier et al., 1996; Weber et al., 1996; Santolamazza-Carbone et al., 2004; Darrouzet et al., 2007). However, additional information could also help the female to adjust her progeny allocation on already parasitized hosts, such as the sex of the juvenile on the host (van Baaren et al., 1999), its age (Visser et al., 1992), or its species (Gauthier et al., 1999). Age, i.e., the development stage of the first juvenile, is an important factor, as it could strongly influence the survival of an egg laid on an already parasitized host. The probability of survival of the second egg generally decreases as the time between the first and second oviposition increases (van Baaren & Nénon, 1996). This is due to the previous hatching of the first egg: the first instars actively seek eggs and larvae on the hosts, and try to eliminate these competitors by attacking them with their mandibles (van Alebeek et al., 1993). If the survival of the second juvenile depends on the development stage of the first, we could expect a strong evolutionary pressure on the female to be able to assess this development

stage and to adjust her oviposition strategy accordingly. While some studies have shown the influence of the time interval between ovipositions on a female's acceptance of a parasitized host (Yamada & Ikawa, 2005), or on the survival of the second egg laid (Visser et al., 1992; van Baaren & Nénon, 1996), these studies have not generally investigated these two aspects in combination. However, Goubault et al. (2003) have shown that females of the solitary pteromalid *Pachycrepoideus vindemniae* Rondani adapt their oviposition strategies according to the development stage of the first juvenile, from egg to pupal stages. Furthermore, the period of egg maturation on the host could be particularly important. Because of the capacity of the first immature to kill eggs, the survival of a second egg should strongly decrease after the first egg hatches. Therefore, the oviposition strategies of superparasitizing females during this period (before hatching) are crucial to their fitness. To our knowledge, the capacity of parasitoid females to assess egg development on a host prior to superparasitism has never been demonstrated.

The main purpose of this study was to investigate whether isolated females of a solitary parasitoid wasp can assess the developmental stage of a previously deposited egg and if they adjust their reproductive strategy accordingly. *Anisopteromalus calandrae* Howard (Hymenoptera: Pteromalidae) is a solitary generalist ectoparasitoid which attacks many coleopteran pest larvae and pupae (Ahmed, 1996) and is used throughout the world for biological control of pests in seed stock. We investigated (1) the host-discrimination capacity (ability to discriminate between unparasitized and parasitized hosts) of ovipositing females, and (2) the survival probability of an experimentally deposited egg under superparasitism conditions depending on the time interval after the first egg was laid. We then analyzed whether females could adapt their oviposition strategies, i.e., superparasitism, ovicide, and offspring sex ratio, when confronted with a host parasitized by an egg just laid and a host parasitized by an egg about to hatch.

Materials and methods

Rearing conditions

Anisopteromalus calandrae were reared in the laboratory on larvae and pupae of one of their natural hosts from the tropical zones of West Africa, Callosobruchus maculatus (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). Both C. maculatus and A. calandrae originated from Ivory Coast (collected in 2000) and were reared in the laboratory under conditions close to that of their area of origin: 12 h light at 30 °C, 12 h dark at 22 °C, and 71% r.h. Two homozygous strains

of A. calandrae were isolated in 2003, one red-eyed mutant (R) and one black-eyed wild type (B), to allow the offspring to be monitored. As previous studies found no differences in oviposition behaviours between the two strains (Do Thi Khanh et al., 2005; Darrouzet, personal observations), the oviposition strategy of only one strain was tested in the following experiments.

General methods

To obtain parasitoid eggs, five gelatine capsules each containing one *C. maculatus* L4 larva were offered to a group of 10 virgin *A. calandrae* females of a single strain confined to an arena (2.5 cm high × 8 cm in diameter). Hymenoptera parasitoids reproduce by arrhenotokous parthenogenesis, whereby fertilized (diploid) eggs develop into females and unfertilized (haploid) eggs into males. By using virgin females we were thus able to obtain male eggs only, thereby preventing a bias due to the sex of eggs presented to tested females. The bruchid L4 larvae were placed inside the capsules after removal from seeds by dissection and selection by size (9.12 ± 0.20 mg). The gelatine capsules mimic the bruchid pupal chamber in the seed and are accepted for oviposition by females (Darrouzet et al., 2003). Oviposition activities occurred at L12 (30 °C): D12 (22 °C) and 71% r.h. At the end of the exposure period, eggs on parasitized hosts were located under a dissecting microscope and manipulated as described below.

Mated females were obtained by placing a 2-h-old virgin female with a 24-h-old virgin male of the same strain in a Petri dish. Mating was confirmed by direct observation.

Host discrimination capacity of an ovipositing female

We wished to investigate whether females are able to discriminate between unparasitized and parasitized hosts. Groups of 10 virgin females (strain B) were exposed to five hosts for 8 h. Parasitized capsules were isolated and stored at 4 °C overnight. Capsules with parasitized hosts (one egg per host) were then used to prepare reproductive patches that were offered to isolated mated females of strain R. Each patch contained a circle of six equidistant gelatine capsules each containing one host. To perform aggregates of hosts with different qualities, two areas were prepared (Darrouzet et al., 2007): three adjacent capsules contained one unparasitized host, and three contained a host parasitized 24 h earlier by a virgin female of strain B. For 5 days, individual R-mated females (n = 11) could lay eggs in patches containing unparasitized and parasitized capsules (two 4-h exposure periods per day).

At the end of each 4-h exposure period, the positions of all eggs laid on unparasitized and parasitized hosts were noted and each egg laid on a host was transferred onto a different unparasitized host and deposited in a separate cell in a Plexiglas sheet closed by a Plexiglas cover-slide until emergence of the parasitoid adults (Darrouzet et al., 2003; 2007). At emergence, the maternal origin of each individual was identified by its eye colour (strain R or B). The sex ratio (proportion of males) was noted at emergence for the individuals (secondary sex ratio) in each series of experiments (with or without indirect competition). At the start of each 4-h period, entire patches were replaced (Darrouzet et al., 2003; 2007).

The sex ratio of females without competition was controlled in another experiment in which R-mated females were confronted with patches composed of six unparasitized hosts. The experiment was performed as previously described.

Survival of supernumerary eggs

We wished to investigate whether the development stage of an egg on a host could influence the survival of a second egg added to that host. Virgin females of both R and B strains were offered hosts for a 1-h period and eggs were collected as previously described. Eggs of a given strain (R or B) were deposited individually on a host and stored in a climatic chamber. After different time intervals covering the entire development of the first egg, i.e., 0 (n = 79), 2 (n = 76), 5 (n = 82), 6 (n = 80), 22 (n = 50), 24 (n = 61), and 30 h (n = 77), a second freshly laid egg from the other strain was added to the parasitized host. Under our experimental conditions, hatching took place after about 31 h. Oviposition intervals of 8-16 h were not considered because that would imply that oviposition took place during the night, when A. calandrae females do not oviposit (Lebreton, personal observation). The replicates were balanced so that the first eggs deposited came almost equally from one strain or the other. At emergence, the phenotype (eye colour) of the surviving individual was noted for each oviposition interval.

Discrimination of the age of eggs

Are females able to discriminate between a host parasitized by an egg just laid (2 h) and one parasitized by an egg about to hatch (28 h)? These two extremes were used to analyse the oviposition behaviour of females confronted with hosts of different quality. Strain B virgin females were allowed to oviposit during 2-h intervals on unparasitized hosts. After this period and/or after 28 h, gelatine capsules with parasitized hosts were collected. One capsule of each category (2 or 28 h, only one egg per capsule) was placed in a Petri dish in a climatic chamber

and presented to an R-mated female for a choice test (n = 61). The oviposition sequence was noted: first capsule visited, capsule selected (i.e., the capsule on which the female settled after examining the patch), time elapsed before oviposition, and oviposited capsules. After oviposition, the female was removed and each egg was transferred onto a different host and deposited in a separate cell in a Plexiglas sheet until emergence of parasitoid adults. After emergence, the sex ratio of the second egg laid (identified by the adult's eye colour) and the mortality rate of the first egg laid (to determine whether the action of the second female would interfere with the development of the first egg) were determined for each kind of selected capsule (2 and 28 h).

Statistical analysis

To analyse host discrimination capacity, a non-parametric paired design (Wilcoxon test) was used to compare the number of eggs laid on the parasitized and unparasitized hosts and the number of hosts parasitized. A χ^2-test was performed to analyse sex ratios.

The proportion of surviving eggs deposited under superparasitism conditions was analysed in relation both to oviposition intervals and to each B-R and R-B combination using a General Linear Model (GLM) with a logit link and a binomial error distribution. Factor effects were analysed using a χ^2-test on a complete model containing the following effects: oviposition intervals, combination of strains, and the interval*combination interaction.

To analyse whether females could discriminate the age of the egg, a χ^2-test was used to analyse the choice test results and the sex ratio. A Fisher's exact test was used to compare sex ratios with a small sample. A non-parametric Mann-Whitney U-test was used to analyse the laying time. Analyses were carried out with R software (R 2.1.1, R Development Core Team, Free Software Foundation Boston, MA, USA). For all tests, a threshold level of $P<0.05$ was used.

Results

Host discrimination capacity

In an indirect competition context, significantly more unparasitized hosts were attacked ($Z = 2.93$, $P = 0.0033$) and more eggs were laid on them than on parasitized hosts ($Z = 2.93$, $P = 0.0033$; **Figure 16**). The overall sex ratio in the entire patch was female biased (0.42; $\chi^2 = 7.1$, d.f. = 1, $P = 0.007$) and not different from those laid by females without competition (0.37; $\chi^2 = 1.84$, d.f. = 1, $P = 0.17$). The sex ratio deposited on unparasitized hosts (0.42) was similar to

that on parasitized hosts (0.44; χ^2 = 0.18, d.f. = 1, P = 0.67). Under our conditions, 16% of eggs failed to develop.

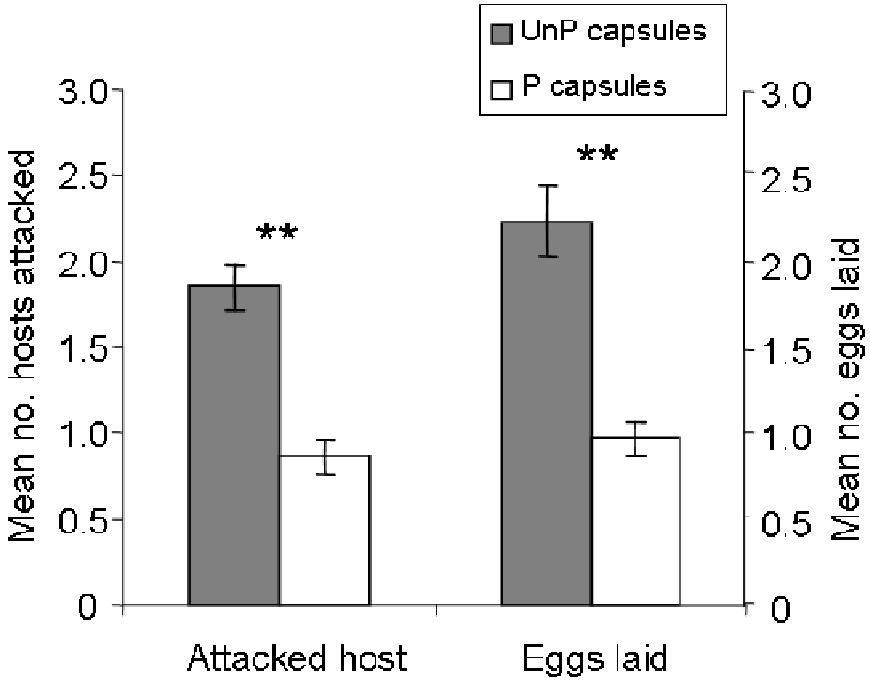

Figure 16 Mean (± SE) number of *Callosobruchus maculatus* hosts attacked and eggs laid by mated *Anisopteromalus calandrae* females per patch (n = 11) when ovipositing on unparasitized (UnP) or previously parasitized (P) hosts. ** P<0.01.

Survival of supernumerary eggs

The proportion of surviving eggs deposited under superparasitism conditions was similar for the two strains (R and B; GLM: Deviance = 0.29, d.f. = 1, P = 0.59), and their variations with oviposition intervals were not significantly different (GLM: Deviance = 2.03, d.f. = 1, P = 0.15). The incidence of survival decreased as oviposition intervals increased (GLM: Deviance = 34.83, d.f. = 1, P<0.001; **Figure 17**). The probability of survival of two eggs laid simultaneously on the same host was the same (0.53; χ^2 = 0.26, d.f. = 1, P = 0.61), whereas it decreased to 0.16 for an egg deposited 30 h after the first egg (**Figure 17**). In our experiments, 15% of B eggs and 18% of R eggs failed to develop under single-development conditions, with no difference between the two strains (χ^2 = 0.21, d.f. = 1, P = 0.65).

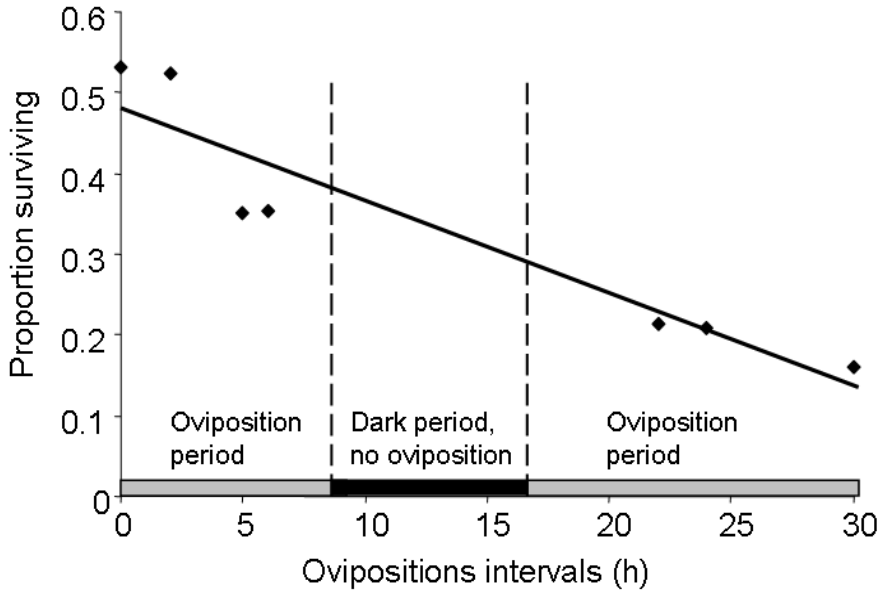

Figure 17 Relationship between the proportion of surviving *Anisopteromalus calandrae* eggs deposited under superparasitism conditions and the time elapsed since the first egg was laid. Proportion of surviving eggs observed (diamond) and linear regression (solid line). No differences were found between the two strains.

Discrimination of the age of eggs

In the choice test, 9.8% of females did not examine any capsule. There was no significant difference in the first capsule visited, but the females selected the hosts parasitized for 2 h significantly more often than those parasitized for 28 h (**Table 1**). About half (49.1%) of these females did not lay eggs on parasitized hosts, but when they did, it was significantly more often on those parasitized for 2 h (**Table 1**). Forty-eight percent of ovipositing females laid an egg on a host after rejecting the other one; most of them (73%) rejected the 28-h capsule and laid eggs preferentially on the 2-h parasitized host (χ^2 = 4.49, d.f. = 1, P = 0.03). Duration of oviposition was similar for 2-h and 28-h parasitized hosts (53.3 ± 5.03 min for 2 h and 52.5 ± 10.46 min for 28 h; Z = 0.47, P = 0.64).

The sex ratios of eggs laid on 2-h and 28-h parasitized hosts were similar (0.12 and 0.15, respectively; Fisher's test: P = 0.49) and female biased (χ^2 = 13.5, d.f. = 1, P<0.001). Under superparasitism conditions, the mortality rate of the first egg laid (22%) was not significantly different from the control (16.5% for single parasitism) under our experimental conditions (χ^2 = 0.87, d.f. = 1, P = 0.35).

Table 1 Behavioural and oviposition strategies of *Anisopteromalus calandrae* females confronted with *Callosobruchus maculatus* hosts parasitized once, at 2 or 28 h previously. Number of host larva types visited first, selected, and oviposited upon by the female wasps.

	Host parasitized 2 h previously	Host parasitized 28 h previously	χ^2	d.f.	P-value
First capsule visited	33	22	2.20	1	0.138
Host selected	34	13	9.38	1	0.002
Egg laid	19	8	4.48	1	0.034

Discussion

The present study demonstrates that *A. calandrae* females adapt their level of acceptance of a parasitized host according to the development of the first egg laid on the host. In solitary parasitoids, where only one adult can emerge from a host whatever the number of eggs initially laid, it is adaptive for females to distinguish between unparasitized and parasitized hosts. However, the quality of parasitized hosts may vary due to the development of the first juvenile, and the female may gain an advantage by discrimination based on that quality.

As expected, *A. calandrae* females discriminated unparasitized from parasitized hosts and laid more eggs on unparasitized hosts which could be considered to be of better quality. This discrimination ability has been demonstrated in most parasitoid species tested (Gauthier et al., 1996; Santolamazza-Carbone et al., 2004; Darrouzet et al., 2007). For *A. calandrae* females, the benefits of recognizing parasitized hosts translate into a higher probability of egg-survival on unparasitized hosts. The sex ratios produced by isolated females when in indirect competition are female-biased and not different from those produced by females which are not in a competition context. These results run counter to the LMC theory (Werren, 1980), which predicts that under indirect competition conditions females will produce more sons in order to inseminate daughters of other females. However, *A. calandrae* is a solitary species, and it is possible that females do not adjust their sex ratio as predicted by the LMC, as already observed in *Anaphes nitens* Girault (Santolamazza-Carbone & Cordero Rivera, 2003). In our experiment, all the eggs offered to females were male; under this condition, if females are able to recognize the sex of eggs previously laid, laying more males is with no benefit to them when no female eggs have been laid in the vicinity. A similar result has

previously been reported by Werren (1984) with *Nasonia vitripennis* (Walker) females, in which the sex ratio was not influenced by the competition context when the first female was virgin.

Our main results indicate that *A. calandrae* females can recognize whether the hosts they encounter have been parasitized by eggs just laid or by eggs about to hatch. They can therefore adapt their oviposition according to the probability of their offspring reaching adulthood. When two eggs are laid at the same time on the same host, their chance of survival is about 50%, but the incidence of survival of the second egg deposited on a parasitized host decreases to about 16% when the time interval between the two ovipositions increases. Hosts with an egg which is about to hatch are thus of lower quality for the female, who therefore avoids these hosts, ovipositing preferentially on a recently parasitized host, i.e., one on which their offspring has a greater chance of survival. This result suggests that *A. calandrae* females have developed highly sensitive discrimination capacities to maximize their fitness. However, the present study analysed the oviposition strategies of females confronted with hosts containing eggs at developmental extremes. We did not analyse their capacity to discriminate between hosts containing eggs at intermediate developmental stages, although this affects the probability of their offspring winning the competition.

How can a female assess the developmental stage of a previously deposited egg? Is it the same cue used by a female to discriminate unparasitized from parasitized hosts? Host discrimination is often mediated by a chemical marker (van Alphen & Visser, 1990) deposited on the seed or host by ovipositing females. This substance originates from the Dufour gland and is deposited after oviposition (Marris et al., 1996; Jaloux et al., 2005). Under our experimental conditions, we observed that half the females that laid an egg oviposited after visiting and rejecting the other host, which was usually the 28-h parasitized host. Before rejecting a host, many females examined the capsule with their antennae, without introducing their ovipositor into the capsule (Lebreton, personal observations). This suggests that there could be a chemical cue at the surface of the capsule, probably perceived by receptors on the antennae. The females' ability to discriminate based on the time elapsed since a previous oviposition could be based on a quantitative or qualitative modification of this marker. It is also possible that different cues give sequential information about the parasitized status of the host over time (Outreman et al., 2001) and could be responsible for the observed discrimination of egg age. Further studies are thus necessary to determine the nature of the cue involved in discrimination by *A. calandrae*.

When encountering parasitized hosts, females could also kill the first egg (ovicide) prior to ovipositing their own egg. However, the low mortality level of the first egg laid suggests that *A. calandrae* females do not perform ovicide. In fact, ovicide is only adaptive when the time and energy costs to the female which perform it are low compared to the benefit gain for her egg (Netting & Hunter, 2000). The fact that ovicide is not performed by *A. calandrae* females could be due to their inability to localize previously deposited eggs precisely.

To conclude, the present work furthers our understanding of the recognition and avoidance of already parasitized hosts. *Anisopteromalus calandrae* females detect the parasitized status of hosts and act accordingly. In superparasitized hosts, the probability of the first parasitoid larvae winning the contest with conspecifics increases with the time interval between ovipositions. Females have therefore developed highly sensitive discrimination capacities regarding host quality in order to increase their fitness.

Acknowledgements

We would like to thank G. Boivin, J. Varaldi, S. Lacoume, A.M. Cortesero, and three anonymous reviewers for providing useful comments on the manuscript, and E. Yates for correcting the English.

Article 3

Modifications of the chemical profile of hosts after parasitism allow parasitoid females to assess the time elapsed since the first attack

Lebreton, S., Christidès, J.-P., Bagnères, A.-G., Chevrier, C. & Darrouzet, E. (en préparation pour *Journal of Chemical Ecology*)

Abstract

In solitary parasitoids, only one adult can emerge from a given host. In some of these species, when several eggs are laid on the same host, supernumerary individuals are eliminated by lethal larval fights. In the solitary parasitoid *Anisopteromalus calandrae*, the probability a second larva win the fight strongly depends on the time elapsed since the first oviposition. The most the first egg is old at the moment at the second egg is laid, the less the second egg have chance to win the competition. As a consequence, females of this species lay preferentially their eggs on recently parasitized hosts rather than on hosts parasitized by an egg about to hatch.

A. calandrae females parasite bruchid larvae located into cowpea seeds. In a series of choice test experiments using an artificial seed system, we demonstrated that the cue perceived by parasitoid females allowing them to discriminate hosts parasitized for different times is not brought by the seed nor by the egg previously laid but by the host. Moreover, pentane extracts of bruchid larvae elicited a similar response than hosts themselves. This cue is perceived at short range distance, indicating that chemicals involved in this discrimination are probably partly volatile. Interestingly, although parasitism stops hosts' development, their cuticular profiles continue to evolve, but in different way than those of unparasitized hosts. Indeed, chemical analyses of pentane extracts show differences in the cuticular profiles of hosts after parasitism evolving with time and probably at the origin of the discrimination by parasitoid females.

Introduction

Parasitoid females have to localize hosts to lay their eggs. This location is often mediated by semiochemicals which could have different origins, such as volatiles released by plants when attacked by herbivores, chemical markers left by host females when they oviposite or host sex or aggregative pheromones (For a review see (Hilker & McNeil, 2008). For example, the Aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) is attracted by volatiles emitted by the blackcurrant when attacked by Aphids (Birkett et al., 2000). In the same way, the Pteromalid wasps *Dinarmus basalis* and *Anisopteromalus calandrae* could localize their hosts, Bruchid larvae, into cowpea seeds thanks to chemical marker deposited by the Bruchid females after oviposition (Kumazaki et al., 2000; Onodera et al., 2002).

After locating their hosts, females have to decide which hosts to parasite. Indeed, all the hosts are not of equal quality and one of the most important parameter influencing this quality

is the parasitized status of hosts. Already parasitized hosts are often considered as worse quality hosts compared to unparasitized ones, because of the competition between larvae resulting from several clutches laid on the same host (Godfray, 1994). In some solitary parasitoids, when several eggs are laid in or on the same host, larvae fight until the death of all but one immature. Only one adult can therefore emerge from a given host in these species (Hubbard et al., 1987). Parasitoid females are generally able to discriminate these two categories of hosts (Gauthier et al., 1996; Weber et al., 1996; Darrouzet et al., 2007; Lebreton et al., 2009b). This discrimination capacities could be based on different chemicals like markers deposited by the first parasitoid during parasitisation (Völkl & Mackauer, 1990) as well as alarm pheromones produced by the host itself after having being stung for the first time (Outreman et al., 2001). It seems thus disadvantageous for a parasitoid female to lay several eggs on the same host or to lay eggs on already parasitized hosts. This behaviour called superparasitism has though been demonstrated to be adaptive under certain circumstances especially when unparasitized hosts are very scarce or when travels between oviposition patches are too long (van Alphen & Visser, 1990).

When females are confronted to several parasitized hosts, the survival probability of their offspring could vary from one host to another depending on different factors. Among these factors, the time elapsed between the two ovipositions is one of the most important (Visser et al., 1992; van Baaren & Nénon, 1996; Goubault et al., 2003; Lebreton et al., 2009b). In fact, at the moment when the second egg is laid, the older the first egg is, the less the second egg will have a chance to win the competition. This is due to the previous hatching of the first egg. The earlier the first egg hatched, the more the larvae originating from this first egg will have time to kill the second egg prior to its own hatching (Godfray, 1994). In a previous study, we demonstrated that, in the solitary ectoparasitoid *Anisopteromalus calandrae*, the survival probability of a second egg strongly decrease when the time interval between the two ovipositions increases (Lebreton et al., 2009b). Whereas two eggs laid in the same time interval have about the same probability to win the competition, the survival probability of the second egg reach only fifteen percent when it is laid few times before the hatching of the first egg. As a consequence, females lay preferentially their eggs on host recently parasitized rather than on those parasitized by an egg being about to hatch (Lebreton et al., 2009b). The present study aimed to identify the stimuli at the origin of this discrimination capacity. *A. calandrae* females parasite larvae of bruchids contained into cowpea seeds. When a female encounters a seed containing a host, she taps the surface of the seed with her antennae to precisely locate the host, and then, she inserts her ovipositor into the

seed in order to probe the host. The cue perceived by females could thus come from an external marker deposited by the first female after oviposition. But it could also be due to an internal marker originating from the host in response to the first sting or from the presence of the egg itself.

In the present study, we wished to investigate whether the cue perceived by females and involved in the discrimination between hosts parasitized for different times is originated from the seed, the host or the egg. For this purpose, using an artificial seed system (Gauthier & Monge, 1999; Darrouzet et al., 2003), we performed a series of choice tests, in which we presented to females either parasitized seeds, eggs previously laid or parasitized hosts. After locating the cue, we identified the chemical signal involved by gas chromatography and mass spectrometry analyses.

Materials and Methods

Insects Rearing

Anisopteromalus calandrae were reared in the laboratory on larvae and pupae the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Both *C. maculatus* and *A. calandrae* originated from Ivory Coast (collected in 2000) and were mass-reared under conditions close to that of their area of origin: 12 h light at 29 °C, 12 h dark at 22 °C, and 65% r.h.

Behavioural analyses

In order to obtain parasitized hosts, we used an artificial seed system composed by gelatine capsules which contain a bruchid larva (Gauthier & Monge, 1999; Darrouzet et al., 2003). The bruchid L4 larvae were placed inside the capsules after removal from seeds by dissection and selection by size. Five capsules were proposed to a group of five virgin females during a two hour period, in a climatic chamber. Because Hymenopteran parasitoids reproduce by arrhenotokous parthenogenesis, virgin females were able to lay only male eggs which avoid a bias due to the sex of the eggs during the choice test. At the end of the exposure period, eggs on parasitized hosts were located under a dissecting microscope and parasitized artificial seeds were selected for choice tests.

Choice tests were composed by two artificial seeds, one parasitized for two hours (recently parasitized capsule) and the other parasitized for 28 hours (parasitized by an egg being about to hatch) in a Petri dish (Lebreton et al., 2009b). In order to determine whether the cue perceived by females is located on the capsule, on the egg, or on the host, three

categories of tests were performed by proposing the three different parts of the artificial seed system to the females. In test 1, choice tests consist in the presentation of 2 hours and 28 hours old parasitized capsules containing an unparasitized host. In test 2, 2-hour-old and 28-hour-old eggs were proposed in a clean capsule, on an unparasitized host. Finally, in test 3, hosts parasitized for 2 hours and 28 hours, on which eggs had been previously removed, were proposed in a clean capsule.

In a previous study, we demonstrated that mated females distinguish 2h and 28h parasitized artificial seeds (Lebreton et al., 2009b). In order to avoid a bias due to the mating status of females, in the present study, we also confronted mated females to these choice tests in a climatic chamber (29 °C, 65% r.h.). All the oviposition sequence was observed (first capsule visited, capsule with oviposition). The tests ended as soon as females lay an egg on the selected capsule but lasted no more than two hours to avoid the hatching of the first egg during the test. After the test, females were removed from the Petri dish. The first capsules visited and the selected capsules were noted. The proportion of females selecting each category of capsules in each category of test was then calculated and compared to those obtained in a control choice test from a previous study (with capsules containing all the parts of the system: the parasitized host with its egg into the parasitized capsule) (Lebreton et al., 2009b). Statistical analyses were performed with a χ^2*-test*.

Chemical Analysis of hosts' cuticular profile

We managed to identify chemical compounds present on hosts' cuticle. For this purpose, samples of one bruchid larva were extracted in 10 µL of pentane, in which 2 µL of an internal standard (C20) were added, for 1 min. Samples were analyzed with a Perkin-Elmer Autosystem XL GC (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and interfaced with Turbochrom workstation software. Each sample was dried up to 2 µL. These 2 µL were then injected in the GC-FID injector heated at 220°C in splitless mode, and analyzed using a BP1capillary column that was temperature programmed from 50°C (2 min hold) to 310°C at 7°C/min with a final hold of 10 min. Five categories of hosts were analyzed: Larvae parasitized for 2h (P 2h) or 28h (P 28h) and unparasitized Larvae stored in the same conditions than 2h (UnP 2h) or 28h parasitized hosts (UnP 28h). As after 28h, some of unparasitized larvae evolve to a pre-pupa stage, unparasitized pre-pupae (UnP Pre-pupae) were also analyzed. The components were then identified by GC-MS analysis, performed using a Hewlett-Packard 5890 GC system coupled to a 5989A MS, controlled by a HPUX chemstation. A "2h parasitized hosts" and a "28h parasitized hosts" samples were

injected in the GC/ MS injector following the same program as described above. In order to analyze whether there was a difference in the cuticular profile of the different categories of hosts, we performed a discriminant analysis based on the relative amount of the 30 major peaks.

Bioassays with hosts chemical extracts

In order to confirm that compounds observed in GC-MS are responsible for the discrimination of the time elapsed since the first oviposition by parasitoid females, we performed another series of choice tests. In these tests, mated females (n=42) were confronted to two capsules, each containing an unparasitized host on which we deposited an extract of parasitized hosts. These extracts were obtained by immersing individually 100 hosts parasitized for 2h or 28h in 200 µl of pentane for one minute. Then, 2µl of each extract (2h or 28h; equivalent to one host) were deposited on an unparasitized host previously rinsed in pentane to remove its own chemical compounds. One host of each category (with the "2h parasitized" or "28h parasitized" extract) were used to perform the choice tests. Tests took place in a climatic chamber as previously described. First capsule visited and capsule with oviposition were noted. The proportion of each category of capsules visited in first and on which females oviposited was then calculated. Statistical analyses were performed with a χ^2*-test*.

Results

Behavioural Analysis

In tests 1 and 2, parasitoid females visited in first as many capsules of each category (test 1, $\chi^2 = 0.03$, dl = 1, P = 0.87; test 2, $\chi^2 = 0.61$, dl = 1, P = 0.43) and laid as many eggs in each category of capsules (**Figure 18**; test 1, $\chi^2 = 1.58$, dl = 1, P = 0.21; test 2, $\chi^2 = 0.03$, dl = 1, P = 0.85). In test 3, most of females (69.2%) visited in first the capsules containing the 2h parasitized host rather than the 28h parasitized host ($\chi^2 = 7.69$, dl = 1, P = 0.006). Moreover, most of them (72.7%) selected the 2 hours parasitized hosts to lay their eggs (**Figure 18**; $\chi^2 = 6.82$, dl = 1, P = 0.009). This result is in accordance with that observed when females were confronted to the whole system (**Figure 18**; control; $\chi^2 = 4.48$, dl = 1, P = 0.034).

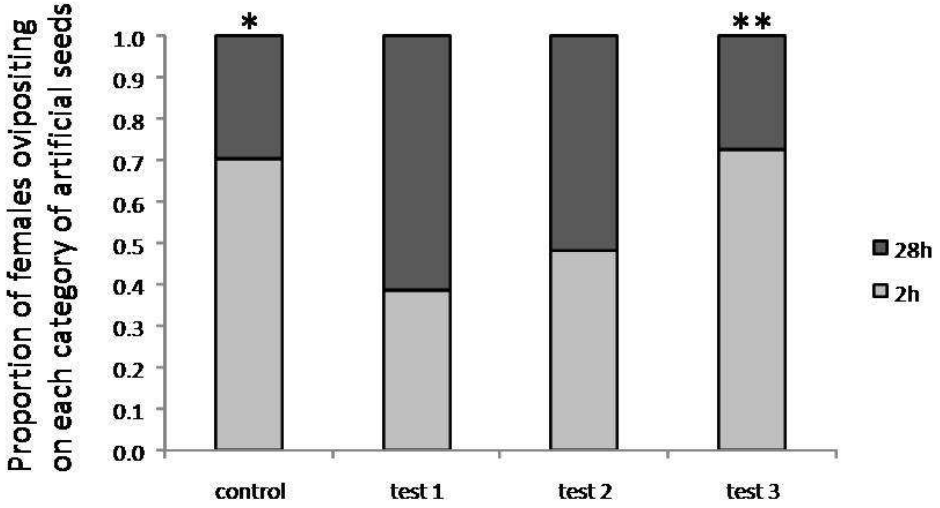

Figure 18 Proportion of females selecting each category of artificial seeds to lay their eggs (2h or 28h parasitized) when confronted to each category of tests: the whole parasitized system (control), parasitized capsules with an unparasitized host (test 1), eggs on an unparasitized host into a clean capsule (test 2) and parasitized hosts on which eggs were previously removed, in a clean capsule (test 3). Marks show significant differences between proportions observed and a random distribution of 50:50. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Chemical Analysis of hosts' cuticular profile

The GC-MS analysis shows the presence of 44 major peaks (**Figure 19**) and 71 identified component (**Table 2**) on hosts. These include a series of n-alkanes and methyl-branched alkanes (C_{25}-C_{35}; **Table 2**). The same compounds were found on the different categories of hosts but in different proportions (**Table 2**). The discriminant analysis underlines a difference between UnP Pre-pupae and UnP Larvae (UnP 2h: F = 3.53, dl = 30.1, p = 0.020; UnP 28h: F = 3.35, dl = 30.1, p = 0.023) and no differences were found between the two categories of UnP Larvae (F = 1.21, dl = 30.1, p = 0.39; **Figure 20**). Whereas P 2h were not different from UnP 2h (F = 1.28, dl = 30.1, p = 0.30), P 28h were different from P 2h (F = 3.64, dl = 30.1, p = 0.018) and had a tendency to diverge from UnP 28h (F = 2.39, dl = 30.1, p = 0.073; **Figure 20**). P 28h were also different from UnP Pre-pupae (F = 3.12, dl = 30.1, p = 0.031; **Figure 20**).

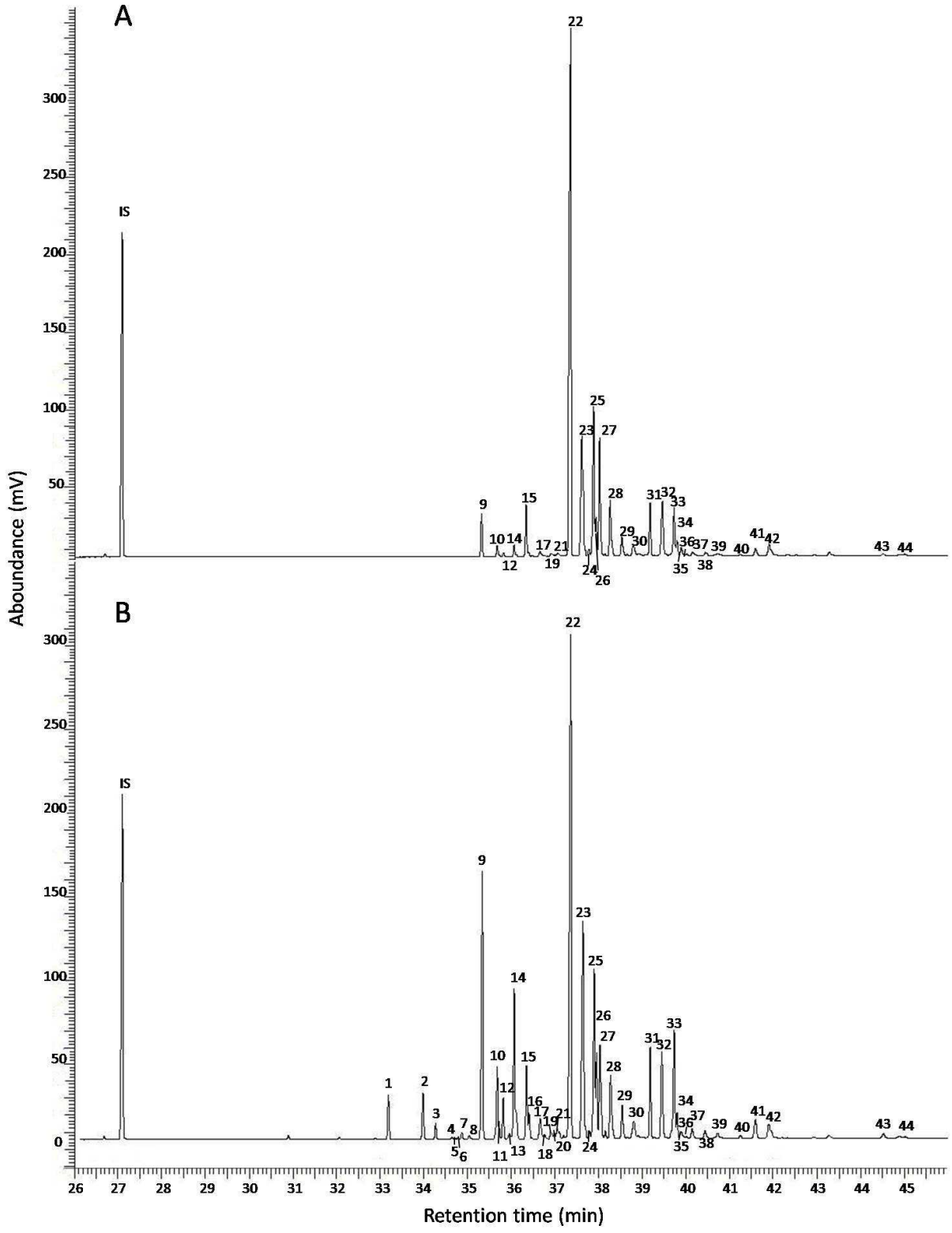

Figure 19 Gas chromatogram of the cuticular pentane extract of hosts parasitized for 2h (A) or 28h (B). IS= internal standard.

Table 2 Cuticular hydrocarbons present on the host's cuticle with their relative amount on each category of host

Peak	Hydrocarbons	ECL[a]	CN[b]	Relative amount (% of total)				
				UnP 2h	UnP 28h	P 2h	P 28h	UnP pre-pupae
1	*n*-C25	25.00	25	0,23	0,25	0,21	0,55	0,59
2	3-MeC25	25.68	26	0,07	0,10	0,14	0,40	0,44
3	*n*-C26	26.00	26	0,10	0,22	0,17	0,30	0,46
4	9MeC26	26.3	27	0,00	0,01	0,03	0,06	0,04
5	6-MeC26	26.47	27	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
6	5-MeC26	26.49	27	0,03	0,01	0,01	0,02	0,05
7	4-MeC26	26.51	27	0,01	0,03	0,03	0,10	0,10
8	3-MeC26	26.67	27	0,02	0,03	0,04	0,13	0,13
9	*n*-C27	27.00	27	4,88	9,99	6,29	8,58	10,19
10	9-MeC27	27.30	28	0,75	0,83	1,45	2,63	2,18
11	7-MeC27	27.32	28					
12	5-MeC27	27.43	28	0,11	0,23	0,35	0,65	0,57
13	9,15-DiMeC27	27.59	29	0,11	0,19	0,18	0,32	0,25
14	3-MeC27	27.69	28	0,78	1,54	1,62	3,54	3,36
	5,9-DiMeC27	27.72	29					
15	*n*-C28	28.00	28	4,00	4,77	4,05	3,46	3,70
16	3,9-DiMeC27	28.05	29	0,21	0,20	0,15	0,09	0,24
17	10-MeC28	28.26	29	0,27	0,32	0,46	0,77	0,65
18	6-MeC28	28.30	29	0,01	0,04	0,03	0,14	0,06
19	4-MeC28	28.50	29	0,11	0,20	0,16	0,32	0,28
20	2-MeC28		29	0,03	0,07	0,09	0,10	0,04
21	3-MeC28	28.64	29	0,07	0,26	0,29	0,51	0,41
22	*n*-C29	29.00	29	56,95	48,43	47,55	34,47	36,66
23	15-MeC29	29.28	30	5,25	4,79	7,32	10,44	7,52
	13-MeC29	29.28	30					
	11-MeC29	29.28	30					
	9-MeC29	29.30	30					
	7-MeC29	29.32	30					
24	5-MeC29	29.39	30	0,14	0,15	0,26	0,33	0,27
25	9,13-DiMeC29	29.49	31	5,26	5,45	5,72	7,06	6,05
26	7,11-DiMeC29	29.60	31	0,80	1,45	1,11	1,45	1,93
	7,13-DiMeC29	29.60	31					
27	3-MeC29	29.68	30	2,44	4,14	3,75	4,08	4,08
28	*n*-C30	30.00	30	4,02	3,32	3,44	3,20	3,67
	3,9-DiMeC29	30.05	31					
	3,11-DiMeC29	30.05	31					
	3,13-DiMeC29	30.05	31					
29	14-MeC30	30.28	31	0,80	0,82	1,05	1,23	1,11
	12-MeC30	30.28	31					
30	10,14-DiMeC30	30.48	32	0,62	0,79	0,84	0,92	0,95
	9,13-DiMeC30	30.48	32					
	8,12-iMeC30	30.48	32					
	8,18-DiMeC30	30.48	32					
31	*n*-C31	31.00	31	4,96	4,03	3,86	3,65	3,76

32	15-MeC31	31.28	32					
	13-MeC31	31.28	32					
	11-MeC31	31.28	32	2,27	1,98	2,97	3,34	2,47
	9-MeC31	31.30	32					
	7-MeC31	31.30	32					
33	9,13-DiMeC31	31.46	33	2,43	2,81	3,23	3,48	3,75
34	7,11-DiMeC31	31.59	33					
	7,13-DiMeC31	31.59	33	0,44	0,24	0,39	0,49	0,52
	3-MeC31	31.66	32					
	5,13DiMe-C31	31.64	33					
35	*unknown*			0,30	0,38	0,38	0,33	0,51
36	*n*-C32	32.00	32	0,04	0,08	0,06	0,06	0,15
37	3,9,13-TriMeC31	32.05	34	0,25	0,29	0,30	0,34	0,46
38	14-MeC32	32.28	33	0,18	0,20	0,26	0,28	0,30
	12-MeC32	32.28	33					
39	10,14-DiMeC32	32.46	34	0,11	0,15	0,21	0,20	0,16
40	*n*-C33	33.00	33	0,13	0,13	0,10	0,15	0,29
41	15-MeC33	33.28	34	0,31	0,30	0,48	0,59	0,50
	13-MeC33	33.28	34					
42	11,15-DiMeC33	33.48	35					
	9,13-DiMeC33	33.48	35	0,48	0,64	0,75	0,89	0,94
	7,11-DiMeC33	33.60	35					
43	*n*-C35	35.00	35	0,04	0,09	0,13	0,15	0,09
	13-MeC35	35.29	36					
44	13,17-DiMeC35	35.46	37					
	11,15-DiMeC35	35.48	37	0,02	0,06	0,12	0,17	0,09
	9,13-DiMeC35	35.48	37					

[a]ECL = Equivalent Chain Length

[b]CN = Carbon number

Bioassays with hosts chemical extracts

Most of females (70.7%) visited the capsule containing the "2h parasitized" extract in first (χ^2 = 7.04, dl = 1, P = 0.008). Ovipositing females have even a tendency to lay a little more eggs on these hosts (64.3% vs. 35.7% on hosts with the "28h parasitized" extract) but the difference is not significant (χ^2 = 2.29, dl = 1, P = 0.13).

Discussion

Chemicals are known to play a crucial role for host location in parasitoids (Afsheen et al., 2008). Host cues could have many different origins such as oviposition markers (Kumazaki et al., 2000; Onodera et al., 2002), chemical residues left by adult hosts on the substrate (Colazza et al., 1999; Peri et al., 2006; Colazza et al., 2007), chemicals originally from host faeces (Meiners et al., 1997; Steidle et al., 2003; Steiner et al., 2007; Inoue & Endo, 2008) or even possibly carbon dioxide (Hilker & McNeil, 2008). Some of these chemicals arise from

adults' activity and are often used by egg or larval parasitoid females to locate their hosts. However, other chemicals could directly come from larvae and these compounds could not only give the information of the presence of a host, but also of the parasitized status of this host (Outreman et al., 2001). In our study, we show a new level of information as semiochemicals could inform the parasitoid on the time elapsed since the first parasitism.

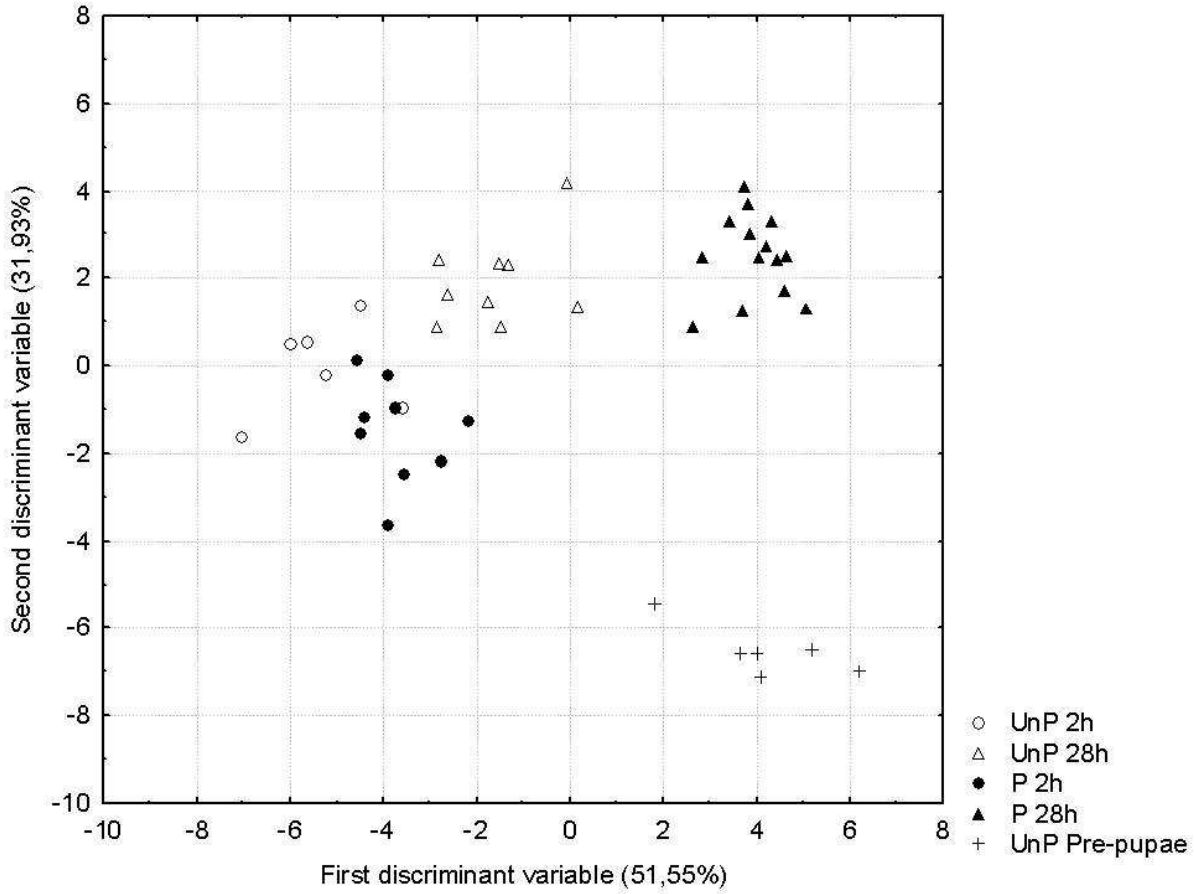

Figure 20 Discriminant analysis based on the relative amount of the 30 major peaks of the cuticular profile of the different categories of hosts (L4 larvae parasitized for 2h or 28h, unparasitized L4 larvae stored in the same conditions than 2h and 28h parasitized hosts, and unparasitized pre-pupae).

With a series of choice tests, we demonstrated that the cue perceived by females to inform them on the time elapsed since the first oviposition is nor located on the seed, neither produced by the egg, but situated on the host. Our results show that most of tested females visited the capsule containing the 2 hours parasitized host in first (test 3, 70%), indicating that compounds implicated in this discrimination capacity are not detected by contact but at a distance. When females were introduced in the choice test, they came near the capsules and reached out their antennae before choosing a capsule (Lebreton, personal observation). This

observation indicates that the cue is perceived at a short range distance. In a previous study (Lebreton et al., 2009b), when parasitoid females were confronted to the complete system (parasitized capsule, parasitized host and egg), the proportion of them which visited the 2 hours parasitized host in first was not so marked than those observed in the present study (60%). In this previous experiment, females were confronted to a more “noisy” environment, as other cues could be present on or into the seeds such as oviposition markers or chemicals produced by the egg. In fact, infochemicals have to be distinguishable from the noisy background (Turlings et al., 1995; Hilker & McNeil, 2008). These other cues could in some extent mask the compounds emitted by the host (Schroeder & Hilker, 2008).

When females were confronted to the chemical compounds only (experimentally deposited on an unparasitized host), they were attracted by the host exhibiting the “most recently parasitized” profile. However, although they have a tendency to lay their eggs onto these hosts, this choice is not as marked as for hosts really parasitized (Lebreton et al., 2009b). This result suggests that several cues could actually be necessary for a female to perfectly assess the quality of hosts. During the first parasitism, *A. calandrae* females also paralyze their hosts by injecting venom into these hosts (Lebreton et al., 2009a). In this experiment, hosts are unparasitized and are therefore not paralyzed. It is possible that hosts firstly perceived by females as “recently parasitized hosts” at a distance, are then considered as not really parasitized because of their non-paralyzed status.

In a previous study, Outreman and coworkers (2001) showed that an alarm pheromone produced by Aphids after being parasitized allows parasitoid females to determine whether a host is already parasitized or not. They correlated an antennal rejection of parasitized host with the presence of the pheromone in the hours following the first parasitism. Then, as the pheromone disappeared, the antennal rejection makes way for a sting rejection. This result indicates that several cues could succeed to give the same information. In our study, the difference in the cuticular profile of hosts is mostly visible after 28 hours. It is thus possible that this cue could not inform parasitoids on the parasitized status of hosts just after the parasitism whereas other cues, such as oviposition markers deposited by parasitoids, give the information for shorter periods. Actually, when *A. calandrae* females oviposite on unparasitized hosts, they generally deposit a substance with their ovipositor after laying an egg (Lebreton, personal observation). Moreover, when confronted to parasitized capsules (test 1), females have a tendency to select a little more 28 hours parasitized capsules even if this difference is not statistically significant from a random choice. This observation could be in accordance with an oviposition marker more detectable shortly after its deposit. Oviposition

markers are originally from the Dufour gland. In *A. calandrae*, the Dufour gland contains a mix of *n*-alkanes (C_{30} to C_{39}) (Howard & Baker, 2003).

Our results show differences in the cuticular profiles of hosts analyzed. First, concerning unparasitized hosts, their profiles depend on their developmental stages, as larvae and pre-pupae exhibit different profiles. Concerning parasitized hosts, their profile also evolves with time, as it is different between hosts parasitized for 2h and 28h. However, it evolves in a different way than in unparasitized hosts. Although unparasitized pre-pupae and 28h parasitized hosts' profiles closed in according to the first discriminant variable, they diverged from each other according to the second discriminant variable. This result suggests that parasitism affects the evolution of hosts' profile. The compounds identified (a series of linear and methyl alkanes) were in accordance with those previously identified by Howard (2001). Although these hydrocarbons consist in heavy long chains, in our choice test experiments, parasitoid females were able to detect the time elapsed since the first oviposition at a short range distance, i.e., outside the capsule. Nevertheless, considering the high temperature in our experimental procedure (29°C), some of these compounds could be semi-volatiles (Saïd et al., 2005). It is thus possible that only the lighter component play a role in this discrimination. This hypothesis is in accordance with our results which show that the major difference between 2h and 28h parasitized hosts is located on these compounds. However, this hypothesis remains to be tested. Another possibility should have been the spontaneous oxidation of these heavy cuticular lipids to volatile aldehydes or alcohols, as already observed in other insect species (Bartlelt & Jones, 1983; Bartlelt et al., 2002). However, the compounds involved in this discrimination are pentane-soluble by immersing bruchids into the pentane solution and are therefore apolar and probably not so volatile.

To conclude, the present study suggests that different cues could be useful to totally assess the wholeness quality of a host. It highlights an evolution of the hosts' cuticular profile after having being parasitized, allowing following parasitoid females to assess the time elapsed since the first parasitism. Even if this evolution is perceptibly different from an unparasitized host, it seems to follow the same global direction. Interestingly, whereas parasitism stops the growth of hosts and disables them to reach the pupation, it does not stop the evolution of their cuticular profile. This result thus opens new questions on the incidence of parasitism on host metabolism.

Article 4

Sex allocation strategies in response to conspecifics offspring sex ratio in solitary parasitoids

Lebreton, S., Chevrier, C. & Darrouzet, E.
(en révision pour *Behavioral Ecology*)

Abstract

Parasitoid females adjust their offspring sex ratio in order to maximize their fitness. The optimal sex ratio they produce varies with several factors, but especially with competition level. In solitary species, only one adult can emerge from a given host, whatever the number of eggs laid. In some species, the mortality of supernumerary individuals could be due to larval combats. This ability to fight could vary from one sex to another within species. In this way, when females explore an already parasitized host patch, the sex ratio of previous eggs can influence their fitness. These two factors could thus strongly influence females' sex allocation strategies. However, this prediction assumes that parasitoid females can assess the sex of eggs previously laid by conspecifics. We used host acceptance and sex ratio behavior to test this capacity, and our experimental data provide the first evidence for this capacity in a parasitoid species. Females of the solitary ectoparasitoid *Anisopteromalus calandrae* discriminated the sex of eggs already laid by a conspecific, but only when these eggs had reached a certain developmental stage. They adapted their offspring sex ratio as predicted by Hamilton's "sex ratio games" model, allocating the sex of their eggs differentially according to the sex of eggs already on the hosts on which they oviposited. In this way they prevented a lethal larval fight between their sons and the females they could potentially mate after their own emergence, simultaneously increasing the fitness of both the mothers and their sons.

Introduction

Sex ratio and sex allocation strategies have a direct impact on the fitness of individuals. While a number of organisms produce equal numbers of males and females (Fisher, 1958), the females of a wide range of species have been shown to adjust their offspring sex ratio, for example, birds (Komdeur et al., 1997), protozoan parasites (West et al., 2001) and parasitoid wasps (Godfray, 1994). In parasitoid Hymenoptera, females adjust their offspring sex ratio through arrhenotokous parthenogenesis, whereby fertilized (diploid) eggs develop into females and unfertilized (haploid) eggs into males. Females adapt their sex allocation strategies in response to several factors such as host quality (Charnov et al., 1981), environmental constraints (King, 1987), overlapping generations (Charnov, 1982) and competition level, which is one of the most important factors (Hamilton, 1967; Werren, 1980; West et al., 2000; King, 2002). In his Local Mate Competition (LMC) model, Hamilton (1967) showed that isolated females produce a female-biased sex ratio, producing the minimum number of sons able to inseminate their daughters. If the number of egg-laying

females increases, they adapt their sex allocation strategies, producing more sons in order to inseminate the daughters of other females. This theory applies to a population of females, and the cues they perceive to evaluate the level of competition could be either direct (the presence of n females) or indirect (e.g. the presence of eggs previously laid in a patch) (Werren, 1980; Shuker & West, 2004; Darrouzet et al., 2008). As the presence of eggs on hosts has been shown to be the primary mechanistic cue of sex ratio adaptation in a competition context (Shuker & West, 2004), the features of a previous clutch should thus influence the sex allocation strategy of a second female. One important parameter is the sex ratio of the first clutch; females should adjust the number of sons they produce according to the number of female eggs laid by other females. In this case, in order to maximize their fitness, females should assess the sex ratio of the first clutch. This capacity has never been demonstrated in any parasitoid species. However, in gregarious parasitoids, Hamilton (1967) predicted that if a female is able to recognize the sex of eggs already present on hosts, the optimal sex ratio of a female which superparasitizes these hosts will depend on the sex ratio of the first clutch. This "sex ratio games" model was further adapted by Werren (1980) who incorporated the relative clutch size. The main predictions of these superparasitism models are that, for a given clutch size, females will lay a higher proportion of male eggs when a majority of females have already been laid on the host. The proportion of male eggs should then decrease as the number of female eggs on hosts decreases. More recently, these superparasitism models have been extended, incorporating the characteristics of specific species. In *Melittobia* spp, for example, the model has been extended to cover lethal combat among adult males to explain extremely female-biased sex ratios (Abe et al., 2003). Likewise, Shuker et al. (2005) included asymmetrical competition for mates between males because of asynchronous emergences that occur in the wasp *Nasonia vitripennis*.

These models were primarily developed for gregarious species in which several individuals could emerge from one host. While it appears that it is less relevant for solitary species which generally lay single eggs, it could be extended to those which reproduce on an aggregate of hosts. In fact, an aggregate of hosts could be considered as a single host on which several parasitoids develop at its expense (even if, in fact, only one individual emerges from a given host of this aggregate). The fact that only one adult can emerge from a host, whatever the number of eggs initially laid, is another important constraint in solitary species. This mortality is due either to lethal larval combats or physiological suppression (Godfray, 1994). In species where larval fights occur, the first instars actively search for eggs and larvae on the hosts and try to eliminate these competitors by attacking them with their mandibles

(van Alebeek et al., 1993). However, this ability to fight varies from one sex to another within species (van Baaren et al., 1999). Differences in competitive abilities could be explained by morphological differences between male and female larvae, such as the number of bristles involved in mobility, an important feature in larval fights (van Baaren et al., 1997; 1999). This asymmetry could strongly affect the oviposition strategy of a female performing superparasitism (laying an egg on an already parasitized host). We could thus expect that ovipositing females would avoid laying eggs on hosts already parasitized by an egg belonging to the better sex competitor and/or have a tendency to lay their better sex competitor on already parasitized hosts.

In this study, we investigated the ability of females of the solitary ectoparasitoid *Anisopteromalus calandrae* Howard (Hymenoptera, Chalcidoidea, Pteromalidae) to distinguish the sex of eggs previously laid by a conspecific. Assessing the exact nature of previously laid eggs is especially important in *A. calandrae* because females, depending on their physiological state, tend to select already parasitized hosts (Lebreton et al., 2009a). We investigated: (1) the larval combat ability of males and females in this species, and (2) whether ovipositing females could assess the sex of eggs previously laid, and how they adjust their sex allocation strategies, based on both the “sex ratio games” model and lethal larval fights between sexes.

Materials and Methods

Rearing conditions

Anisopteromalus calandrae Howard (Hymenoptera, Chalcidoidea, Pteromalidae) is a solitary ectoparasitoid of a wide range of coleopteran pest larvae and pupae (Ahmed, 1996), used throughout the world for biological control of pests in seed stocks. Two homozygous strains of *A. calandrae* were isolated: one red-eyed mutant (noted as R) and one black-eyed wild-type (noted as B) (Do Thi Khanh et al., 2005). The use of these two strains enabled us to monitor the offspring of a given female. Parasitoids were mass-reared on larvae of the bruchid *Callosobruchus maculatus* in a climatic chamber: 12 h light at 28 °C, 12 h dark at 22 °C, and 65% r.h.

Sex competition in larval combat

To obtain eggs, *A. calandrae* females were allowed to lay on an artificial seed system composed of gelatine capsules (Darrouzet et al., 2003). The bruchid larvae were placed inside

the artificial seeds after removal from seeds by dissection and selection by size (9.12 ± 0.20 mg). The gelatine capsules mimic the bruchid pupal chamber in the seed and are accepted for oviposition by females.

To analyze whether females or males were better competitors in larval combat, virgin R and mated B females were allowed to lay eggs on *C. maculatus* larvae for two hours. In a previous study, no differences were found in the competitive abilities of the two strains (Lebreton et al., 2009b) and therefore only one combination was performed in this study. Mated females were obtained by placing a 2-hour-old virgin female with a 24-hour-old virgin male of the same strain in a Petri dish. Mating was confirmed by direct observation. Random eggs of the B strain (males or females) were deposited individually with a random egg of the R strain (male) on the same host (n=284) and placed in a separate cell in a Plexiglas sheet closed by a Plexiglas cover-slide until emergence of the parasitoid adults (Darrouzet et al., 2003; Darrouzet et al., 2007). At emergence, the phenotype and sex of the surviving individual was noted.

The survival rate of an egg laid on an already parasitized host decreases sharply as the time between the two ovipositions increases (Lebreton et al., 2009b). To investigate how the fighting abilities of male or female larvae vary with the time interval, random eggs of the B strain (males or females) were deposited individually with a random egg of the R strain (male) laid with a 28-hour time interval (the first egg about to hatch) on the same host as described above (R egg laid first: n=217; B egg laid first: n=217). At the same time, we determined precisely the proportion of each strain winning a male/male combat by placing two eggs laid by a virgin female (one of each strain) on the same host for the two intervals described above (eggs laid at the same time: n=79; eggs laid with a 28h interval: n=86).

When eggs laid by B mated and R virgin females are placed together, two categories of larval competition occur: one between a B female and an R male, the second between two male larvae (one R and one B). Individuals emerging after larval fights are thus either B females, B males or R males (**Table 3**). As we were unable to determine precisely the proportion of R males emerging from each category of fight, we had to make an estimate, as shown in **Table 3**. From the number of females and the estimated number of males emerging from a female/male combat, it was then possible to determine which sex was the better competitor in larval competitions.

Table 3 Estimation of the number of R males emerging in each category of larval fight.

		Competition categories		
		B female/R male	B male/R male	total
Emerging strain	B	$\mathbf{B_{female}}$	$\mathbf{B_{male}}$	$\mathbf{B_{tot}}$
	R	$R_{tot} - \left[\frac{B_{male}}{P_B} - B_{male}\right]$	$\frac{B_{male}}{P_B} - B_{male}$	$\mathbf{R_{tot}}$

In bold, the observed number of emerging individuals. P_B represents the proportion of B male winning a male/male fight with an R male, obtained with competition between offspring of virgin females.

Egg sex discrimination

Isolated mated R females were exposed to 2 hosts in a choice test experiment, using the same artificial seed system as previously described. One host had previously been parasitized by a male egg (laid by a virgin B female) and the other by a male or female egg (laid by a mated B female). To examine whether females' oviposition strategies evolved with the embryonic development of the egg already on the host, two series of experiments were performed, one with two-hour-old eggs (obtained just after oviposition) and the second with 28-hour-old eggs (just before hatching). The choice tests took place in a climatic chamber (L12:D12, 30°C: 22°C, and 71% r.h.) and ended as soon as the females laid an egg, with a maximum time of 2 hours. The oviposition sequence was observed: the first capsule visited, the capsule selected (corresponding to the capsule on which the female settled after examining the patch), and the capsule with oviposition. After oviposition, the female was removed and each egg was transferred onto a different host and deposited in a separate cell in a Plexiglas sheet in order to avoid larval fights. After emergence, the phenotype (R or B) and sex of individuals were noted, enabling us to differentiate between eggs offered to females during the choice tests and those laid by tested females. Female/male (2h, n=23; 28h, n=43) and male/male (n=32) choice tests were then analyzed separately. For each category of test, the hosts selected for oviposition were noted, and the sex ratio of eggs laid by tested females (proportion of males) was calculated. Because other recent models incorporate characteristics of other parasitoid species or parameters which are not applicable to *A. calandrae*, we compared these sex ratios with those predicted by Werren's model (X^*), which included asymmetry in clutch size:

$$X^* = \frac{\sqrt{2X_0(T+1)} - 2X_0}{2T}$$

where X_0 is the sex ratio of the first clutch and T the ratio of the eggs laid by the first and second females (Werren 1980).

Statistical analyses

To analyze which sex is the better competitor in larval fights, we used a χ^2-test to compare the proportion of females and males emerging from each category of fight to a theoretical proportion of 50:50. To compare the offspring sex-ratios laid by tested females on each category of host (previously parasitized by a male or female egg), a χ^2-test was also performed. Next, to compare these sex-ratios with those predicted by Werren's model, we performed a Fisher's exact test. Analyses were carried out with R software (R 2.1.1, R Development Core Team, Free Software Foundation Boston, MA, USA) and a threshold level of $P<0.05$ was set.

Results

Sex competition in larval combat

Following larval combats between males laid at the same time, each individual had an equal probability of winning the competition, as 53% of B males and 47% of R males emerged ($\chi^2=0.26$, df =1, p=0.61; Fig. 1). Thus, the proportion of R males surviving R male/B male combats with eggs from B-mated females should also represent about 47% of these combats. We can thus estimate, as described in the methods section (**Table 3**), that the number of emerging males represents only about 23.5% of male/female combats (**Figure 21**). These results demonstrate that female larvae have supremacy over male larvae in larval fights ($\chi^2=35.5$, df =1, $p<0.001$) and have a higher probability of winning than a male laid under the same conditions (0.74 vs 0.53; $\chi^2=15.3$, df =1, $p<0.001$; **Figure 21**). Under our experimental conditions, in 8.8% of cases, no individuals reached adulthood.

When eggs were laid with a 28h interval, the probability of the second male winning the competition against a first male was only 25.75% (**Figure 21**). The estimated percentage of females laid 28h after a male egg which emerged from these combats is thus 53.12%. Under these conditions, females lose their supremacy against a male laid 28h before ($\chi^2=0.0017$, df =1, p=0.97) but have a higher survival rate than a male egg laid under the same conditions (0.25; $\chi^2=7.48$, df =1, p=0.006; **Figure 21**). When the female is laid first, the

estimated survival probability of a second male is 18.7%, which is not different from its probability of winning the fight when the two eggs are laid at the same time (23.5%; χ^2=1.34, df =1, p=0.25). Under our experimental conditions, in 16.0% of cases, no individuals reached adulthood.

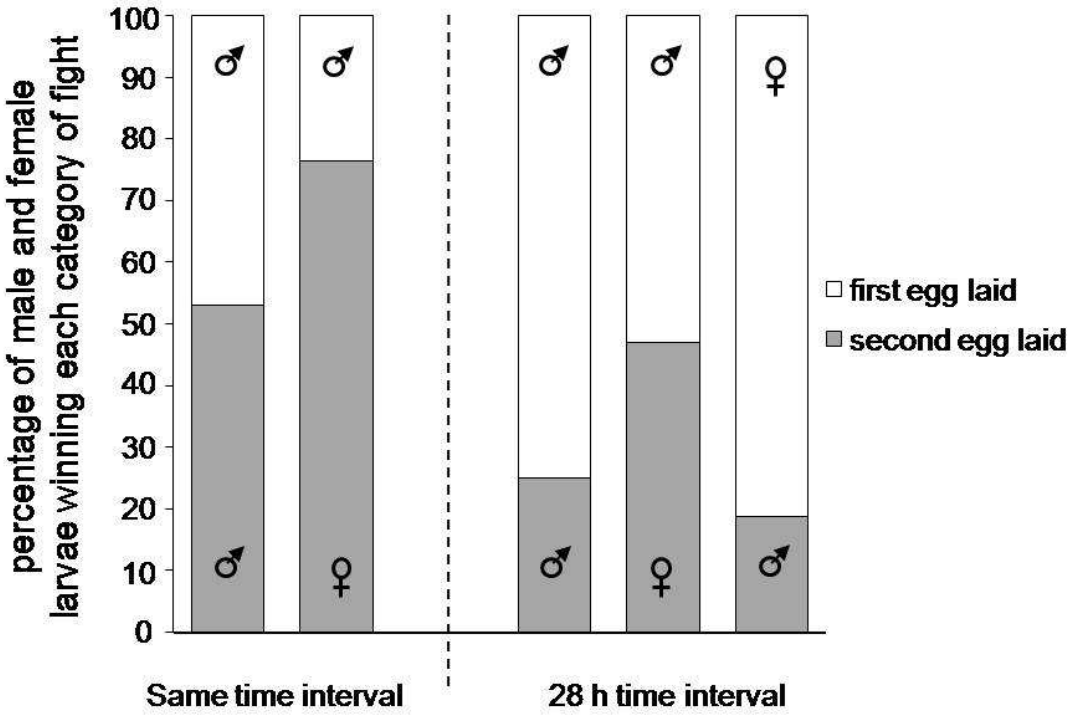

Figure 21 Percentage of larvae of each sex emerging after a fight in a two-larvae contest. Both male/male and female/male competition were investigated with either individuals laid at the same time or with a 28 hours time interval. The outcomes of male/male fights were observed directly, while those of female/male fights had to be estimated (for more details, refer to the method section). With regard to eggs laid at the same time, first and second eggs were chosen arbitrarily.

Egg sex discrimination

With regard to host selection, when confronted with mixed patches containing hosts previously parasitized by a male and a female egg, *A. calandrae* females first visited an equal number of each category of capsules, whatever the developmental stage of the eggs provided (2 hours old: χ^2=0.03, df =1, p=0.87; 28 hours old: χ^2=0.01, df =1, p=0.90). While they selected an equal number of hosts parasitized by male and female eggs when confronted with 2-hour parasitized hosts (χ^2=0.0, df =1, p=1.0), they selected more hosts parasitized by a female egg when confronted with 28-hour parasitized hosts (65.4% of selected hosts; χ^2=4.90,

df =1, p=0.03). Nevertheless, they laid as many eggs on hosts parasitized by a female as by a male egg, whatever their developmental stage (**Figure 22**; 2-hour-old, χ^2=0.04, df =1, p=0.83; 28-hour-old, χ^2=2.80, df =1, p=0.09).

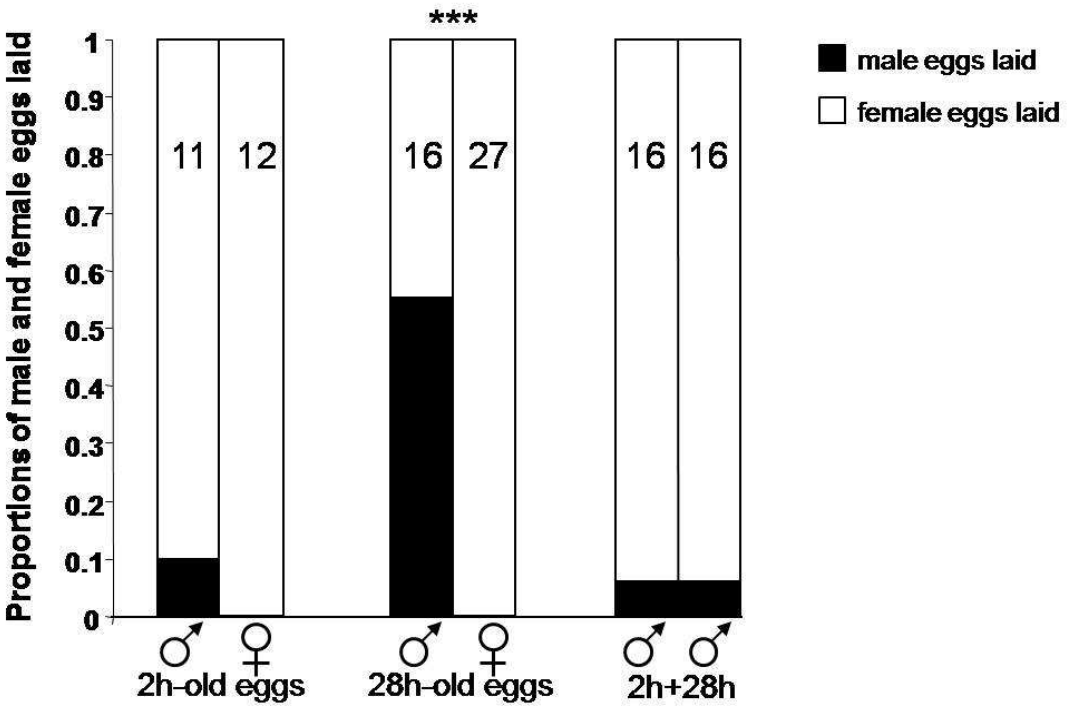

Figure 22 Adjustment of the females' offspring sex ratio according to both sex and the developmental stage of the eggs of a previous clutch. Proportions of male and female eggs laid on previously parasitized hosts obtained in a male/female choice test with 2-hour-old (just after oviposition) or 28-hour-old (about to hatch) eggs, or a male/male choice test (in male/male choice tests, as results are similar whatever the developmental stage of first eggs (Fisher test, p=1.0), results with 2-hour-old and 28-hour-old eggs have been pooled). Marks show a statistical difference between the sex ratio of eggs laid on hosts previously parasitized by a male egg and by a female egg (*** p<0.001). The values in each bar represent the number of tested females oviposited on each category of host.

With regard to sex allocation, when confronted with a host parasitized by 2-hour-old male or female eggs, the females allocated the sex ratio (proportion of males) of their offspring (SR=0.10) in the same way as those confronted with a host containing only male eggs (SR=0.06) (**Figure 22**; Fisher test, p=0.93). However, females allocated sexes differentially on hosts parasitized by a male or female egg when these eggs were 28 hours old (about to hatch, **Figure 22**). In this case, they produced more sons on hosts already parasitized by a male egg (SR=0.55) than on those parasitized by a female egg (SR=0; **Figure 22**; Fisher test, p<0.001).

When *A. calandrae* females were confronted with patches containing two hosts, one parasitized by a female and one by a male egg about to hatch (X_0=0.5), they laid eggs with a sex ratio of 0.17, which is similar to the value predicted by Werren's model (X*=0.22; Fisher test, p=1.0). When there were only male eggs on hosts (X_0=1), the observed sex ratio (0.06) was also similar to that predicted by the model (X^*=0; Fisher test, p=1.0).

Discussion

In some solitary parasitoids, because of asymmetries in larval combats (van Baaren et al., 1999), the survival probability of an egg laid under superparasitism conditions depends largely on the sex of other eggs laid on that host. Therefore, in these species, the ability of a female to assess the sex of eggs previously laid could have a direct impact on her fitness. The present study provides evidence of this capacity in a parasitoid species.

In *A. calandrae*, when two eggs are laid during the same time interval, female larvae win more larval combats than males, with about 75% of fights ending in a female victory. Therefore, when the previous eggs have been recently laid, females often lay a female egg (which has a higher probability of winning the competition) under superparasitism conditions. Interestingly, in this study, females never laid a male egg on a host already parasitized by a female egg. Because males are poorer competitors in larval combats, a male egg laid on a host already parasitized by a female egg has a low probability of reaching adulthood. Therefore, a female should avoid laying a male egg in this situation. Moreover, if the male wins the competition, it means that it killed the female larvae, and by killing females before their emergence, it reduces its own reproductive success at the adult stage. Therefore, by not laying male eggs on hosts already parasitized by female eggs, *A. calandrae* females avoid a lethal fight between their sons and females which they could possibly mate after their own emergence. In this way, females increase both their sons' reproductive success and their own fitness. However, the loss of fitness induced by killing a female would be negligible compared to the low probability of winning the fight. This would therefore be the main factor explaining why females did not lay any male eggs on hosts previously parasitized by a female egg.

Although the supremacy of females in larval fights could be mainly attributed to fighting abilities, we cannot exclude the possibility that an intrinsic differential mortality between sexes during their egg or larval development partly explains this competitive asymmetry. However, without fight, under our experimental conditions, the mortality of males was generally low (less than 10%, Lebreton, personal observation) and not significantly

higher than the mortality of clutches containing both male and female eggs. This cannot therefore be the only factor responsible for the asymmetry.

Nevertheless, females did not avoid laying eggs on hosts parasitized by female eggs (the better sex competitor) as might be expected. They even had a tendency to select a capsule containing a host parasitized by a female egg when the eggs were about to hatch. However, when female eggs were laid on a host which had been parasitized for a long time by a male egg (28h), they lost their supremacy in larval fights, with only 50% of females emerging from a male/female competition, although they still had a higher probability of winning the competition than a male egg laid under the same conditions (50% vs 25%). Consequently, being laid 28h after a first male reduces the probability of winning the competition by 25%, whatever the sex of the second individual. This decrease is mainly due to the previous hatching of the first egg, as the larva from this first egg could kill the second egg before it hatches (Godfray, 1994). But when the first individual laid is a female, the probability of a second individual winning the fight if it is laid 28h later seems to decrease only slightly (less than 5% for a male). This result could thus be explained either by an inability of females to localize other eggs or by a weaker aggressiveness of females towards these eggs. In any event, this result could partly explain why ovipositing females have a tendency to select more hosts parasitized 28h before by a female egg. In fact, on these hosts, their offspring have little risk of being killed before hatching.

Nevertheless, hosts which have been parasitized for 28 hours, especially by a male egg, could thus be considered as worse quality hosts, which could explain the higher proportion of sons laid on these hosts, as predicted by the “host quality model” (Charnov et al., 1981). Moreover, the loss of female supremacy in larval fights could induce less benefit in laying only female eggs. Under this condition, and if the second individual has a non-null probability of winning the fight, it could be better for the female to lay a male egg, which is less costly to produce as it does not use spermatozoa. Indeed, *A. calandrae* females mate only once, and after successive matings, males do not transfer enough spermatozoids to females to produce female eggs throughout their reproductive life (Do Thi Khanh, 2005). In this case, it is possible that females become sperm limited. It could thus be more profitable for females to adjust their sex allocation strategies according to the sex ratio of the first clutch (in order to maximize their offspring’s reproductive success) rather than to their offspring’s fighting abilities. *A. calandrae* females have previously been shown to respond to both Local Mate Competition and host quality (Nishimura & Jahn, 1996).

Previous experimental studies failed to demonstrate an egg sex discrimination ability in parasitoids (van Baaren et al., 1999), in spite of a number of theoretical studies dealing with this topic (Hamilton, 1967; Suzuki & Iwasa, 1980; Werren, 1980; Abe et al., 2003). Werren (1980) suggested that the relative size of the two clutches is more important in sex ratio adaptation than the sex ratio of the previous clutch. However, according to this model, for a given relative clutch size, the sex ratio of the first clutch plays a primary role in sex allocation strategies. In 1999, van Baaren *et al.* were unable to demonstrate this discrimination capacity in a solitary parasitoid species (*Anaphes victus*), but the hosts offered to the second females in their study had been parasitized less than one hour before. It is possible that eggs have to reach a certain developmental stage for females to be able to distinguish their sex. The present study demonstrated that *A. calandrae* females adjust their sex allocation strategies only when they are confronted with 28-hour-old eggs (about to hatch) and not when eggs are 2 hours old (recently laid). While we showed that females may have no benefit in adjusting their offspring sex ratio when they are confronted with newly laid eggs, this lack of laying adjustment could also be due to an inability to discriminate the sex of newly laid eggs. Ovipositing females could thus perceive a cue which evolves as the eggs develop. However, there are no visible morphological differences between male and female eggs in *A. calandrae* prior to hatching (personal observation). It is therefore possible that eggs produce a sex-related cue during their development which could be perceived by ovipositing females. However, to our knowledge, differences in the chemical profile of eggs according to their sex have never been shown.

While sex ratio games have already been identified in some experimental studies (Werren, 1980; Werren, 1984; Shuker et al., 2005; Abe et al., 2007), the present study confirms the model first described by Hamilton, i.e., an adjustment of offspring sex ratio according to those of conspecifics. In line with the models of Hamilton (1967) and Werren (1980), *A. calandrae* females only laid a higher proportion of male eggs when females were laid in the vicinity. In fact, females have no benefit in laying male eggs if there are no female eggs nearby to inseminate after their emergence. At the same time, when females compete with virgin conspecifics, they are not expected to adjust their offspring sex ratio in the same way as when confronted with only mated competitors. This hypothesis is supported by the constrained model (Godfray, 1990), which predicts a more female-biased offspring sex ratio when females are confronted with constrained conspecifics (virgin, sperm-depleted or mated with a sterile male) in order to compensate for the excess of males in the population. This factor could be important in *A. calandrae*; as females mate only once, the proportion of constrained females could be significant. The present study suggests that, if this theory is

valid in this species, the main mechanistic cue perceived by mated females could be the sex of eggs laid by virgin females rather than their mating status. Indeed, they do not produce more males when confronted with male offspring of mated females; our results show that ovipositing females responded to the sex of eggs previously laid, not to the mating status of their mother.

To conclude, sex allocation has already been shown to be adjusted in response to several factors, such as the number of females, relative brood size, dispersal status, etc. (West et al., 2005). Here, we demonstrated an extra level of complexity, showing that females can adapt their offspring sex ratio in response to those of clutches laid by a previous conspecific. Through their high discrimination capacity, females can detect the reproductive strategy of conspecifics, thereby increasing their sons' mating success, and at the same time their own fitness.

Acknowledgements

We would like to thank J. van Baaren and two anonymous reviewers for providing useful comments on the manuscript and E. Yates for correcting the English.

Conclusion de la partie

Les femelles *A. calandrae* ont développé d'importantes capacités de discrimination leur permettant de distinguer des hôtes parasités de différentes qualités. Elles sont ainsi capables de discriminer d'une part un hôte récemment parasité (depuis 2h) d'un hôte parasité par un œuf sur le point d'éclore (depuis 28h) et d'autre part un hôte parasité par un œuf mâle ou femelle. Cette aptitude est fondamentale chez les espèces solitaires, pour lesquelles la ponte de plusieurs œufs sur un même hôte se traduira par des combats mortels entre larves. Chez *A. calandrae*, les femelles sont de meilleures compétitrices lors des combats larvaires. Plus l'intervalle de temps entre deux pontes augmente et moins le deuxième individu pondu aura de chance de gagner le combat. Ainsi, lorsqu'une femelle pond sur un hôte déjà parasité depuis 28h par un œuf mâle, la probabilité que son descendant remporte l'affrontement est réduit de 25% quel que soit le sexe de celui-ci. Mais lorsque le premier œuf pondu est une femelle, la probabilité de survie d'un individu (mâle en l'occurrence) pondu 28h après ne diminue que de 5% par rapport aux chances de survie qu'il aurait s'il était pondu en même temps. Ce résultat semble indiquer que les larves femelles éliminent moins leurs compétiteurs au stade œuf que les larves mâles.

Lorsqu'elles sont confrontées à des hôtes parasités par des œufs mâles, les femelles parasitoïdes choisissent préférentiellement des hôtes récemment parasités pour y pondre, augmentant ainsi la probabilité de survie de leurs descendants. Cette discrimination est rendue possible grâce à des modifications du profil cuticulaire de l'hôte après le premier parasitisme qui s'accentuent avec le temps ; les femelles *A. calandrae* étant capables de percevoir ces différences.

En ce qui concerne le sexe des œufs précédemment pondus, les parasitoïdes ont besoin que ceux-ci aient déjà atteint un certain stade de développement pour pouvoir déterminer leur sexe. A ce moment là, les femelles pondent une plus grande quantité de fils sur des hôtes parasités par des œufs mâles, mais uniquement lorsque des œufs femelles sont déjà pondus sur d'autres hôtes à proximité. Elles adaptent donc leur propre sex-ratio de ponte en fonction du sex-ratio des œufs précédemment pondus dans l'environnement. La ponte des fils sur des hôtes parasités par des œufs mâles et non par des œufs femelles peut s'expliquer par l'existence des combats larvaires. En effet, un mâle pondu sur le même hôte qu'une femelle n'aurait que peu de chance de gagner le combat du fait de la suprématie des femelles ; et s'il remportait la victoire, cela signifierait qu'il aurait tué une femelle avec laquelle il aurait pu

éventuellement s'accoupler après son émergence. D'autres études seront nécessaires quant à l'identification du ou des signaux permettant aux femelles de distinguer le sexe des œufs.

- DISCUSSION GENERALE -

Ce travail de thèse nous permet d'apporter des éléments nouveaux pour la compréhension des stratégies comportementales employées par les femelles parasitoïdes, lorsqu'elles sont confrontées à des patchs de ponte déjà exploités par des femelles de la même espèce (**Figure 23**). Ainsi nous avons pu mettre en évidence que lorsqu'elles sont confrontées à un patch de ponte hétérogène, composé d'hôtes de diverses qualités, les femelles *Anisopteromalus calandrae* perçoivent la qualité de ces différents hôtes, du moins ceux présents dans leur proche environnement. A l'instar des femelles de nombreuses autres espèces (*Asobara tabida* (van Alphen & Nell, 1982), *Ooencyrtus nezarae* (Takasu & Hirose, 1988), *Epidinocarsis lopezi* et *Leptomastix dactylopii* (van Baaren & Nénon, 1994), *Dinarmus basalis* (Gauthier et al., 1996), *Dinocampus coccinellae* (Okuda & Ceryngier, 2000), *Phymastichus coffea* (Castillo et al., 2004), *Eupelmus vuilleti* (Darrouzet et al., 2007) ou bien encore *Metaphycus flavus* (Tena et al., 2008)), elles sont capables de distinguer les hôtes déjà parasités des hôtes non parasités (Lebreton et al., 2009a; Lebreton et al., 2009b). D'autre part, lorsque plusieurs hôtes sont parasités, elles peuvent discriminer ceux qui viennent d'être parasités de ceux qui sont parasités par un œuf sur le point d'éclore (Lebreton et al., 2009b). De plus, nous démontrons pour la première fois chez un parasitoïde que lorsque les œufs présents sur ces hôtes sont à un stade de développement proche de l'éclosion, les femelles sont capables de reconnaître leur sexe (Lebreton et al., soumis).

Grâce à ces capacités de discrimination les femelles *A. calandrae* peuvent adapter leurs stratégies de ponte. Si elles pondent autant sur des hôtes parasités et non parasités dans des conditions expérimentales de ponte de courte durée ; de manière générale, elles s'alimentent préférentiellement aux dépens d'hôtes déjà parasités (Lebreton et al., 2009a). Cela est en relation avec leur état physiologique (âge, réserves nutritives). L'état physiologique conditionne également la stratégie employée aux dépens de ces hôtes, à savoir la ponte et/ou l'alimentation. Toutefois, lorsqu'elles sont testées sur une durée plus longue (une semaine), les femelles *A. calandrae* ajustent leurs stratégies en pondant préférentiellement sur des hôtes non parasités et par conséquent de meilleure qualité pour le développement de leurs descendants (Lebreton et al., 2009b).

De plus, lorsqu'elles sont confrontées à des hôtes déjà parasités, elles vont pondre préférentiellement sur ceux qui le sont depuis peu de temps pour assurer à leurs descendants une plus grande probabilité de survie. Dans nos travaux, nous avons pu montrer que plus le temps écoulé depuis la première ponte était important, plus la probabilité qu'un individu pondu en deuxième gagne la compétition larvaire était faible (Lebreton et al., 2009b). Une analyse chimique couplée à une étude comportementale a permis de montrer que le choix de

la femelle était basé sur une évolution du profil cuticulaire de l'hôte au cours du temps après le premier parasitisme (Lebreton et al., in prep) .

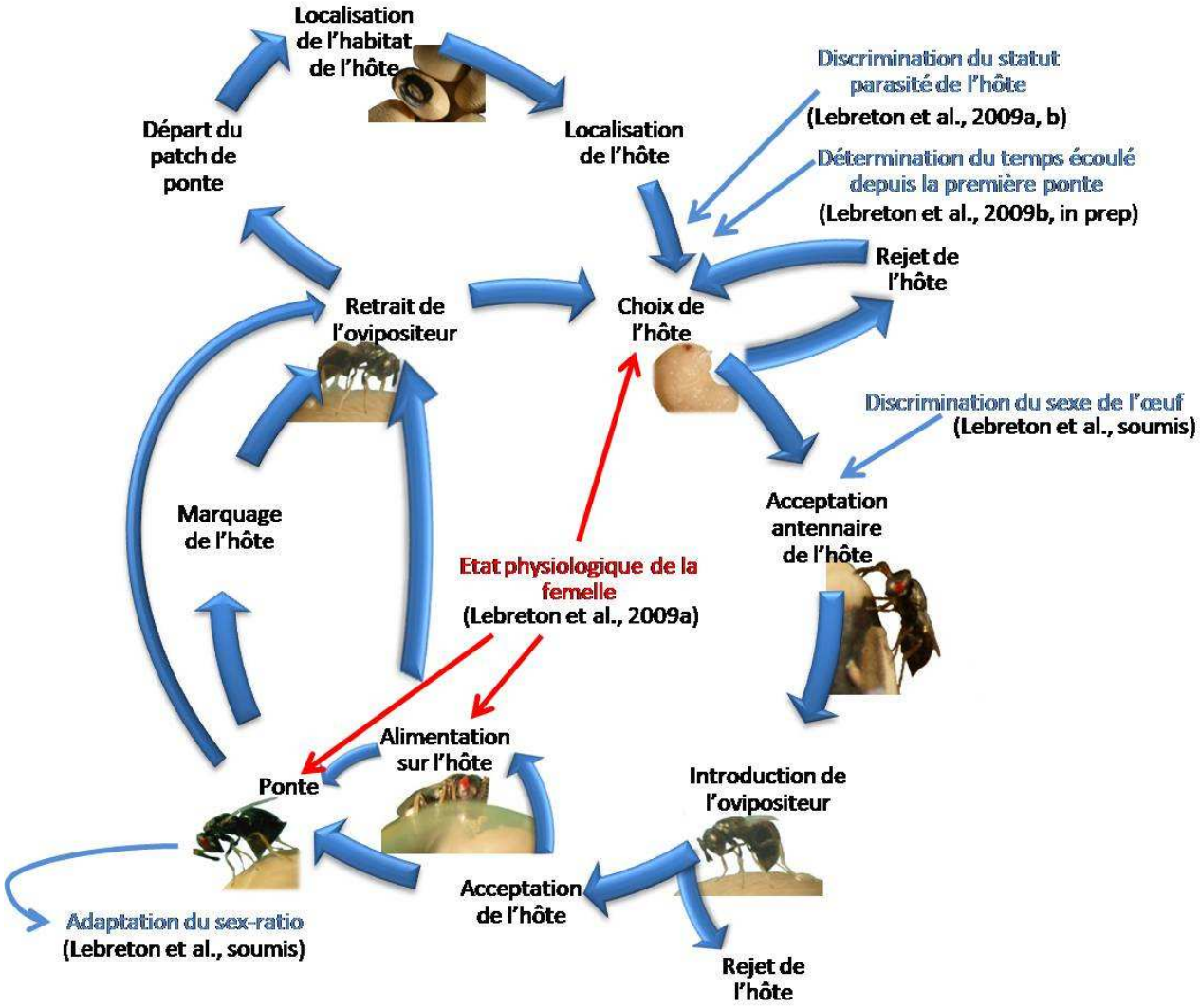

Figure 23 Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de la thèse (modifié d'après Vinson, 1998). Les stratégies de pontes des femelles *A. calandrae* dépendent à la fois de facteurs environnementaux comme la qualité des hôtes (en bleu) ainsi que de facteurs internes tels que leur état physiologique (en rouge). Les femelles perçoivent à distance le statut parasité de l'hôte ainsi que le temps écoulé depuis la première ponte lorsque celui-ci est parasité. Lorsqu'elle est en contact antennaire avec la graine, elle peut distinguer le sexe de l'œuf présent sur l'hôte parasité à l'intérieur de la graine, lui permettant d'adapter son sex-ratio de ponte en conséquence. Quant à l'état physiologique de la femelle (âge, réserves nutritives), il influence à la fois le choix de l'hôte ainsi que la stratégie employée aux dépens de celui-ci (alimentation et/ou ponte).

Enfin, si une femelle est confrontée à des hôtes parasités par des œufs sur le point d'éclore, elle va adapter sa ponte en fonction du sexe de ces œufs. De plus, elle va éviter de

pondre un fils sur un hôte parasité par un œuf femelle ; en effet les femelles sont de meilleures compétitrices lors des combats larvaires (Lebreton et al., soumis).

Ces résultats amènent à se poser certaines questions. Quels sont les mécanismes qui pourraient être impliqués dans les différents choix de la femelle ? Sur quels critères une femelle peut-elle se baser pour choisir de pondre ou de se nourrir en fonction de la qualité de l'hôte ? Quels pourraient être les stimuli responsables de la discrimination d'hôtes de différentes qualités ? Comment les femelles sont-elles capables de déterminer le statut parasité d'un hôte ainsi que le sexe des œufs préalablement pondus ?

En quoi un hôte parasité est-il plus avantageux pour s'alimenter ?

Les trois quarts des femelles s'alimentent préférentiellement aux dépens d'hôtes déjà parasités (Lebreton et al., 2009a). Ce choix d'un hôte parasité pour se nourrir peut être adaptatif car ces hôtes sont également paralysés. Pour fabriquer leurs tubes alimentaires, les femelles introduisent leur ovipositeur dans l'hôte. Après l'injection de certaines substances (Fulton, 1933), un liquide clair remonte le long de l'ovipositeur en se solidifiant le long de celui-ci jusqu'à la surface de la graine (Pupedis, 1978). La femelle retire alors doucement son ovipositeur du tube ainsi formé et vient poser ses mandibules à l'extrémité de celui-ci pour ponctionner l'hémolymphe. Cependant, les tubes alimentaires restent des structures fragiles et le moindre mouvement de l'hôte suffit à les casser (observations personnelles). Les femelles parasitoïdes sont donc contraintes de paralyser l'hôte avant de s'alimenter. Or, la paralysie repose sur la synthèse et l'injection d'un venin dans l'hôte avant la ponte (Quicke, 1997), ce qui a un coût. S'alimenter aux dépens d'un hôte déjà parasité économise donc le coût de la paralysie. Les femelles qui privilégient l'alimentation à la ponte sont probablement celles qui ont les réserves nutritives les plus faibles et qui ont par conséquent besoin de les renforcer. Cela leur permet d'augmenter leur longévité et de favoriser l'ovogenèse afin de maximiser leurs chances de se reproduire ultérieurement (Phillips, 1993; Ueno, 1999b; Giron et al., 2002; Rivero & West, 2005). Il semble donc important pour ces femelles de minimiser le coût énergétique nécessaire à l'alimentation. Elles doivent toutefois maximiser l'apport nutritif en choisissant la source de nourriture la plus riche. Or, les hôtes parasités sont aussi ceux qui présentent la plus faible concentration de lipides dans leur hémolymphe par rapport aux hôtes non parasités (Lebreton et al., 2009a). Les femelles parasitoïdes se trouvent alors confrontées à un compromis entre réduire le coût énergétique lié à l'alimentation (en ce nourrissant sur des hôtes parasités) et maximiser l'apport énergétique (en se nourrissant sur des hôtes non parasités).

Le gain énergétique global (E_{tot}) pour une femelle se nourrissant sur un hôte correspond à la différence entre l'énergie acquise lors de l'alimentation (E) et le coût de cette alimentation (C) divisée par le temps nécessaire pour s'alimenter (T) :

$$E_{tot} = \frac{E - C}{T}$$

Ainsi, une proie représentant la plus grande ressource d'énergie (E) n'est pas forcément la plus profitable si le coût (C) ou le temps (T) passé pour s'alimenter est trop important (Elner & Hughes, 1978). Dans notre cas, le temps passé par les femelles *A. calandrae* pour se nourrir (T) sur chacune des deux catégories d'hôtes est similaire (67,8 min sur un hôte non parasité contre 71,2 min sur un hôte déjà parasité). Cette composante ne devrait donc pas intervenir dans le choix de l'hôte. Dans la plupart des modèles de maximisation d'énergie pour le choix des proies (« energy maximization models »), le coût lié à l'alimentation (C) est en général éliminé, soit parce qu'il est considéré comme négligeable face à l'énergie acquise lors de l'alimentation (Rovero et al., 2000), soit parce qu'il est considéré comme ne variant pas d'une proie à l'autre (Charnov, 1976b). Or, dans notre cas, on peut penser qu'il est à prendre en considération, d'une part parce qu'il n'est probablement pas négligeable, et d'autre part, parce qu'il est différent entre des hôtes parasités et non parasités (Lebreton et al., 2009a). Il est par conséquent possible que la baisse de dépenses énergétiques engendrée par l'alimentation (C) sur des hôtes parasités soit plus importante que la baisse du gain nutritif (E) liée à une disponibilité réduite de lipides. Dans ce cas, le gain énergétique global (E_{tot}) est plus important sur un hôte parasité que sur un hôte non parasité.

Ceci est probablement valable lorsque l'hôte a été récemment parasité comme c'est le cas dans notre étude. Mais qu'en sera-t-il lorsque le temps écoulé depuis le premier parasitisme augmente ? Dans ce cas, si le coût lié à la construction du tube alimentaire (C) reste stable au cours de cette période, le gain de nourriture (E), quant à lui, semble diminuer. En effet, 48h après le parasitisme la concentration en lipides continue de diminuer (passant de 6,33 µg/µL à 3,78 µg/µL), s'accompagnant d'une baisse de près de 50% de la concentration en glucides (passant de 14,68 à 7,83 µg/µL ; données non publiées). Ainsi, plus l'intervalle de temps depuis le premier parasitisme augmente et plus le gain énergétique global (E_{tot}) diminue. Il se pourrait donc que ce gain devienne inférieur à celui perçu sur un hôte non parasité lorsque le temps écoulé depuis le premier parasitisme devient trop important (**Figure 24**). Ainsi, alors qu'il semble avantageux de se nourrir aux dépens d'hôtes parasités depuis

peu ; lorsque ces hôtes sont parasités depuis trop longtemps, il semble préférable pour les femelles de se nourrir aux dépens d'hôtes non parasités (**Figure 24**).

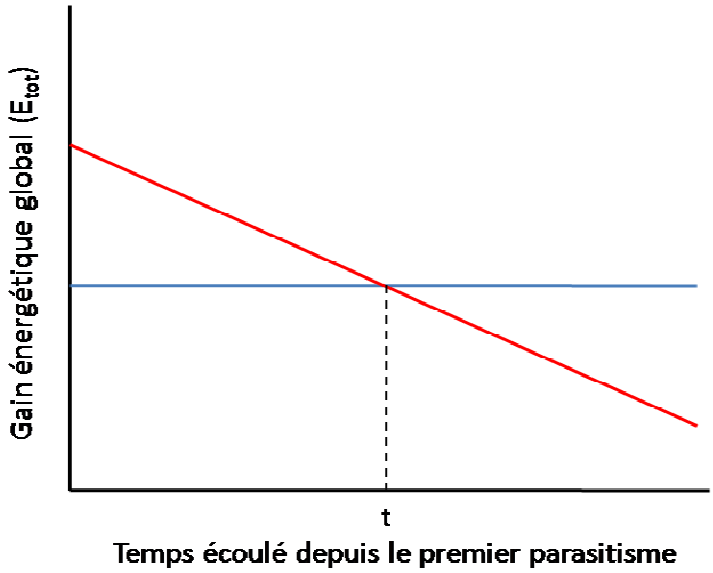

Figure 24 Modèle proposé pour le gain énergétique global perçu lors de l'alimentation sur un hôte. Le gain perçu aux dépens d'un hôte parasité diminue au cours du temps après le parasitisme (courbe rouge). Le gain perçu sur un hôte non parasité, quant à lui, reste stable pour un hôte de même stade larvaire (courbe bleue). Dans la période qui suis le parasitisme, il est avantageux pour un parasitoïde de se nourrir sur un hôte parasité. Après un temps t, les deux types d'hôtes représentent la même valeur en termes d'énergie disponible. Lorsque le temps écoulé depuis le premier parasitisme est supérieur à t, il devient avantageux de se nourrir aux dépens d'un hôte non parasité de même stade larvaire que l'hôte parasité au moment du parasitisme.

Différentes études ont montré l'importance du venin dans les processus de modifications de la composition de l'hémolymphe (Rivers & Denlinger, 1995; Nakamatsu & Tanaka, 2003; Salvador & Cônsoli, 2008). A l'inverse des résultats présentés dans notre travail, la plupart de ces études ont observé une augmentation de la concentration en lipides dans l'hémolymphe des hôtes parasités (Rivers & Denlinger, 1995; Nakamatsu & Tanaka, 2003). Cette modification s'explique par la lyse des cellules du corps gras par des phospholipases entraînant la libération de particules lipidiques dans l'hémolymphe (Nakamatsu & Tanaka, 2004).

Comment le résultat observé dans nos travaux (baisse de la concentration en lipides dans l'hémolymphe) peut-il alors être expliqué ? La technique de dosage employée dans notre étude (vanilline phosphorée) permet de détecter les lipides totaux (Van Handel, 1985). Par

conséquent, si les lipides présents dans l'hémolymphe avaient été tout simplement dégradés, en acides gras libres par exemple, par les constituants du venin d'*A. calandrae*, ils seraient toujours détectés. Ceci ne peut donc pas expliquer la différence observée. Les lipides peuvent également être, soit stockés dans les corps gras, soit utilisés pour la synthèse de nouvelles molécules dans les tissus. Chez les insectes, les lipides se retrouvent principalement dans l'hémolymphe sous forme de diacylglycérol (DAG), couplé à une lipophorine. La lipophorine sert ainsi de transporteur pour les lipides entre les cellules du corps gras où ils sont généralement stockés sous forme de triacylglycérol (TAG) et les tissus où ils peuvent être hydrolysés par une lipophorine lipase en acides gras et glycérol (Arrese et al., 2001; Canavoso et al., 2001). La mobilisation des lipides au niveau du corps gras et/ou des tissus pourrait ainsi être une conséquence directe ou indirecte de l'action du venin. En effet, il pourrait s'agir d'une réaction physiologique de l'hôte en réponse au parasitisme. D'autre part, si une partie de ces lipides sont effectivement stockés dans les tissus, ils pourraient être plus facilement accessibles pour la larve de parasitoïde se développant sur cet hôte. Chez certaines espèces il semblerait que les larves se nourrissent en premier de l'hémolymphe de l'hôte (Goubault, 2003; Nakamatsu & Tanaka, 2003). Mais chez *A. calandrae*, aucune étude n'a jusqu'alors mis clairement en évidence quelle partie de l'hôte (tissus ou hémolymphe) était consommée en premier par la larve. Ainsi, l'injection de venin par l'adulte pourrait avoir pour effet de faciliter l'accès à une nourriture riche en nutriments pour la larve au début de son développement (à la fin de son développement, la quasi-totalité de l'hôte étant consommée). Cette hypothèse pourrait en partie expliquer pourquoi les femelles parasitoïdes injectent leur venin dans l'hôte avant de pondre. Toutefois, la raison principale de l'injection de venin est probablement la paralysie. En effet, même si les larves sont capables de se développer aux dépens d'hôtes non paralysés (Doury et al., 1995; Doury et al., 1997), la paralysie semble augmenter la survie du parasitoïde au stade œuf (Doury et al., 1995). Il serait toutefois intéressant d'approfondir cet aspect par des études complémentaires pour comprendre par quels mécanismes le venin des parasitoïdes peut affecter la composition de l'hémolymphe de l'hôte. Pour cela, il faudrait identifier les composants présents dans le venin d'*A. calandrae* qui non pas été déterminés jusqu'à maintenant et analyser de manière qualitative les lipides impliqués dans les modifications observées. Cela complèterait ainsi l'analyse quantitative réalisée dans notre travail. Afin de mieux comprendre à quel moment le venin agit sur les différentes composantes liées à la physiologie de l'hôte (concentration en nutriments dans l'hémolymphe mais également dans les tissus, activité respiratoire, paralysie…), nous pourrions également étudier la cinétique de l'action du venin sur le métabolisme de l'hôte.

Quels sont les stimuli responsables de la perception de la qualité de l'hôte ?

La localisation des hôtes ainsi que la discrimination de la qualité de ceux-ci supposent que les parasitoïdes perçoivent certains stimuli, qu'ils soient d'ordres visuels (Segura et al., 2007), mécaniques (Meyhöfer & Casas, 1999; Djemai et al., 2004), acoustiques (Walker, 1993; Arthur & Hoy, 2006), ou bien chimiques (Hilker & McNeil, 2008). Chez *A. calandrae*, nous avons pu clairement montrer que la détermination du temps écoulé depuis une première ponte est de nature chimique (Lebreton et al., in prep). Suite au parasitisme, le profil cuticulaire de l'hôte évolue, et cela permet aux femelles de déterminer depuis combien de temps cet hôte a été parasité et d'adapter leur ponte en conséquence. Il est intéressant de voir que même si, 28h après le parasitisme, le profil diffère de celui d'une pré-nymphe, il a tendance à évoluer dans le même sens. Ce résultat pose de nouvelles questions quant aux effets du parasitisme sur les modifications métaboliques de l'hôte. En effet, chez les parasitoïdes idiobiontes, l'injection de venin induit la paralysie de l'hôte et l'arrêt de son développement. Une larve parasitée n'entrera donc jamais en nymphose, mais son profil cuticulaire, lui, continuera à évoluer (Lebreton et al., in prep). Le profil des larves de bruches est constitué d'alcanes linéaires et méthylés (C_{25} – C_{35}) (Howard, 2001; Lebreton et al., in prep). Les mêmes composés sont retrouvés sur tous les types d'hôtes mais dans des proportions différentes, notamment en ce qui concerne les produits les plus légers qui sont probablement à l'origine de la discrimination. Alors que certains de ces composés ne sont observés qu'à l'état de traces sur des larves non parasités ainsi que 2h après le parasitisme, ils sont présents en plus grande quantité 28h plus tard, tout comme chez les pré-nymphes (Lebreton et al., in prep). Ces composés sont de nature lipidique et on peut donc se demander s'il existe un lien entre la diminution de la quantité de lipides dans l'hémolymphe dès 2h après le parasitisme et les produits que l'on retrouve à la surface de l'hôte un jour plus tard. En effet, les hydrocarbures cuticulaires sont transportés depuis leur lieu de synthèse jusqu'à la cuticule via l'hémolymphe (probablement couplés à des lipophorines) (Howard & Blomquist, 2005). L'étude de la nature exacte des lipides présents dans l'hémolymphe avant et après parasitisme pourrait nous donner un élément de réponse sur les modifications métaboliques observées chez l'hôte. Cependant, ces composés étant également retrouvés en plus grande quantité sur des hôtes non parasités ayant poursuivis leur développement, il serait intéressant de voir comment la composition d'un point de vue quantitatif de l'hémolymphe de ces hôtes évolue au cours du temps. Dans une précédente étude, Rivers et Denlinger (1995) ont montré

que la composition de l'hémolymphe (notamment concernant les lipides) de quatre espèces d'hôtes différentes n'évoluait pas avec le temps lorsqu'ils n'étaient pas parasités. Le parasitisme pourrait alors soit inhiber la synthèse de nouveaux hydrocarbures, soit bloquer le relargage de lipides dans l'hémolymphe, expliquant ainsi la baisse de la concentration en lipides observée.

Etant donné qu'il existe des différences dans le profil en hydrocarbures cuticulaires d'hôtes parasités et non parasités, il se pourrait que cette information soit également utilisée par les femelles parasitoïdes pour discriminer le statut parasité de l'hôte. En effet, ces modifications sont détectées, non pas au contact direct de l'hôte, mais au moins à quelques millimètres de distance (Lebreton et al., in prep). Or, la distinction entre hôtes parasités et non parasités se fait également à distance. Dans l'hypothèse où ces modifications sont à l'origine de la discrimination hôtes parasités / non parasités, elles pourraient permettre aux femelles parasitoïdes d'éviter de faire du superparasitisme. En effet, de manière générale les femelles *A. calandrae* ont tendance à éviter de pondre sur des hôtes déjà parasités (Lebreton et al., 2009b). La stratégie d'évitement du superparasitisme a été observée chez de nombreuses espèces de parasitoïdes, essentiellement solitaires (Hubbard et al., 1987; Hubbard et al., 1999; Darrouzet et al., 2007; Wang & Messing, 2008). En effet, chez ces espèces, la probabilité de survie d'un œuf pondu en condition de superparasitisme est immédiatement réduite de moitié. Prévenir des cas de superparasitisme pour une première femelle est tout aussi important, notamment lorsque ces descendants sont particulièrement sensibles à la compétition larvaire, c'est-à-dire dans les heures qui suivent la ponte (Lebreton et al., 2009b). Une femelle parasitoïde a donc intérêt à signaler à ses compétitrices qu'elle a déjà parasité un hôte. Néanmoins, l'évolution du profil cuticulaire de l'hôte pourrait ne pas être perceptible deux heures seulement après la première ponte. En effet, les différences présentes dans les profils cuticulaires ne sont pas visibles après un intervalle de temps aussi court (Lebreton et al., in prep). Or, nos résultats montrent que les femelles sont capables de percevoir qu'un hôte est parasité seulement deux heures après le parasitisme (Lebreton et al., 2009a).

Quelle peut alors être la nature des autres informations impliquées dans cette discrimination ? Chez les parasitoïdes en général, cette discrimination repose souvent sur un marquage de ponte (Vinson, 1976; van Alphen & Visser, 1990) ou bien sur des hydrocarbures cuticulaires déposés par frottement de l'abdomen par la première femelle sur le substrat lors de la ponte (Hoffmeister, 2000; Buckner & Jones, 2005). Il a déjà été observé que, sur un hôte non parasité, les femelles *A. calandrae* ont tendance à déposer une substance à l'aide de leur ovipositeur à l'intérieur de la graine artificielle après la ponte (observation personnelle).

Contrairement aux modifications physiologiques de l'hôte (du moins en ce qui concerne son profil cuticulaire), un tel marquage de ponte pourrait être détecté dès son dépôt. En effet, nos résultats montrent que lorsque les femelles sont confrontées uniquement aux gélules ayant contenues un hôte parasité, et non pas aux œufs ni aux hôtes eux-mêmes, elles ont tendance à pondre un peu moins sur les gélules parasitées depuis deux heures, au profit de celles parasitées depuis 28 heures, même si cette différence n'est pas statistiquement significative (Lebreton et al., in prep). Ce résultat peut suggérer qu'en l'absence de tout autre stimulus, les femelles peuvent détecter un marquage déposé sur la gélule (ou la graine) et que celui-ci serait plus perceptible deux heures après son dépôt que 28 heures après. Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'efficacité du marquage de ponte repose sur le fait qu'il puisse être détecté par les femelles parasitoïdes tant que la première larve pondue est susceptible de perdre le combat. (Roitberg & Mangel, 1988).

Une autre hypothèse serait que la femelle parasitoïde soit capable de détecter une baisse de l'activité métabolique de l'hôte, et notamment une baisse de la respiration avec une diminution de la production de CO_2. Chez la chenille de *Manduca sexta*, la production de CO_2 est diminuée dès le lendemain du parasitisme par rapport à celles n'ayant pas été parasitées et chute de 60% la veille de l'émergence des parasitoïdes, période qui coïncide avec une cessation d'activité de la chenille (Alleyne et al., 1997). Chez les parasitoïdes idiobiontes, l'hôte étant paralysé dès le début du parasitisme (lorsque le venin est injecté), cette différence dans l'activité respiratoire pourrait être marquée plus tôt. Beaucoup d'insectes sont capables de détecter des variations de CO_2 (Takken, 1999; Haas et al., 2002; Barrozo & Lazzari, 2004; Faucher et al., 2006; Johnson & Gregory, 2006) mais ce facteur n'a jamais été pris en compte chez les parasitoïdes, ni pour la localisation de l'hôte (Hilker & McNeil, 2008), ni pour la discrimination de son statut parasité.

Des modifications internes de l'hôte peuvent également renseigner un parasitoïde sur son état (parasité ou non). Ce type d'information est souvent utilisé par des endoparasitoïdes (van Baaren & Nénon, 1994; Benedet et al., 2002) et est détecté à l'aide de récepteurs gustatifs situés sur l'ovipositeur (Le Ralec & Wajnberg, 1990; Brown & Anderson, 1998; van Lenteren et al., 2007). Elle est généralement liée au développement de la larve à l'intérieur de l'hôte (Mehrnejad & Copland, 2007). Dans notre cas, il y a également des modifications métaboliques de l'hôte suite au parasitisme (baisse de la concentration en lipides dans l'hémolymphe) qui pourrait être perçues par les femelles. Cependant, le statut parasité de l'hôte étant perçu à distance, il est probable que ce genre d'information ne joue qu'un rôle secondaire.

Une dernière possibilité serait l'utilisation d'un stimulus mécanique et plus précisément vibratoire. Contrairement aux hôtes parasités qui sont paralysés, les hôtes non parasitées sont mobiles. Des vibrations produites par le mouvement des larves dans les graines pourraient renseigner une femelle exploitant un patch de ponte sur la présence d'hôtes non parasités. Il a d'ailleurs été montré que chez *Choetospila elegans*, un parasitoïde du charançon du blé *Sitophilus granarius*, les femelles sont capables de repérer leurs hôtes (larves de charançon) à l'intérieur des grains de blé à l'aide de ces phénomènes vibratoires (Van den Assem & Kuenen, 1958). Il est également possible que des stimuli mécaniques et chimiques puissent intervenir conjointement (Kroder et al., 2007). Ainsi, une femelle *A. calandrae* repérant une larve de bruche à l'aide du marquage de ponte de l'adulte (Onodera et al., 2002) pourrait déterminer son statut parasité à l'aide de signaux de différentes natures (marquage de ponte, évolution du profil cuticulaire, modifications métaboliques…) qui pourraient agir indépendamment les uns des autres ou au contraire en synergie.

La perception de la plupart des signaux permettant aux femelles *A. calandrae* d'appréhender la qualité de leur environnement de ponte semble se faire à distance. Ceci est vrai pour la distinction entre hôtes parasités et non parasités, le temps écoulé depuis la première ponte ainsi que le sexe des œufs présents sur les hôtes déjà parasités, comme nous le verrons par la suite. Cependant, si les jeunes parasitoïdes peuvent discriminer les hôtes parasités des hôtes non parasités à distance, il n'en est pas de même pour les femelles plus âgées. En effet, notre étude montre que les femelles âgées de 15 jours, bien qu'elles soient capables de percevoir le statut parasité de l'hôte, ne le perçoivent pas à distance, contrairement aux femelles de 3 jours (données non publiées). Il y aurait donc une diminution des capacités de perception des stimuli à distance chez les femelles parasitoïdes en devenant plus âgées. Chez le criquet *Schistocerca gregaria*, mâles et femelles répondent de moins en moins à la phéromone d'agrégation avec l'âge (Ignell et al., 2001). Cette diminution est due à une augmentation de la production d'hormone juvénile (JH) au cours de la vie de l'organisme. La JH est connue pour influencer de nombreux comportements chez les insectes adultes, comme la reproduction (Segura et al., 2009), la territorialité (Contreras-Garduno et al., 2009), ou bien encore la division du travail chez les insectes sociaux (Jassim et al., 2000; Smith et al., 2008). Concernant la perception de la phéromone d'agrégation chez *S. gregaria* (Ignell et al., 2001) et probablement plus généralement la perception de volatiles (Anton et al., 2007), la modification avec l'âge n'est pas due à une baisse de sensibilité du système nerveux périphérique (antennaire) mais bien à une action sur le système nerveux central. La JH

pourrait ainsi agir en modifiant indirectement la sensibilité des inter-neurones olfactifs au niveau des lobes antennaires (Anton et al., 2007).

Il serait alors intéressant de mesurer la concentration en JH chez les femelles *A. calandrae* en fonction de leur âge, afin de déterminer si la production de cette hormone peut être à l'origine de la modulation de la perception des composés volatils ou semi-volatils chez cette espèce.

Comment les asymétries dans les combats larvaires influencent-elles les stratégies de ponte des femelles ?

Dans notre travail, nous avons pu également mettre en évidence certaines asymétries dans les combats larvaires chez *A. calandrae*. Une femelle a plus de chances de remporter la compétition qu'un mâle (Lebreton et al., soumis). Un résultat similaire avait déjà été rapporté par van Baaren et al. (1999) chez *Anaphes victus*. Nous avons également montré que la probabilité qu'un individu pondu sur un hôte déjà parasité remporte le combat larvaire diminue avec l'augmentation de l'intervalle de temps entre les deux pontes ; et ceci avant même que le premier œuf n'éclose (Lebreton et al., 2009b; Lebreton et al., soumis). Cependant, cette diminution varie différemment en fonction du sexe du premier œuf (Lebreton et al., soumis). Lorsque le premier œuf pondu est un mâle, un deuxième individu voit sa probabilité de gagner le combat réduite de 25% lorsqu'il est pondu 28h après, et ceci quel que soit son sexe. Mais lorsque le premier œuf pondu est une femelle, dans ce cas, la probabilité de survie d'un deuxième individu baisse de moins de 5% s'il est pondu 28 heures après. Cette diminution est principalement due à l'élimination du deuxième œuf par la première larve (van Alebeek et al., 1993). Ceci laisse à penser que les larves femelles éliminent moins bien leurs compétiteurs au stade œuf que les larves mâles.

Il est possible que cette observation représente un début de transition entre un développement solitaire et grégaire. En effet, les ancêtres de la plupart des familles de parasitoïdes étaient solitaires et le développement grégaires est ensuite apparût à diverses reprises au cours de l'évolution (Mayhew, 1998). Certaines études montrent également que le développement grégaire est en partie dû à une perte de mobilité des larves (Pexton & Mayhew, 2001; Pexton et al., 2003). Dans notre cas, les femelles pourraient être moins mobiles que les mâles et rencontreraient donc moins souvent les autres œufs ; alors que lorsqu'elles se font agresser par d'autres larves, elles sont tout à fait capables de se défendre. C'est notamment le cas chez certaines espèces grégaires chez lesquelles les larves peuvent

remporter un combat initié par une espèce solitaire (Boivin & van Baaren, 2000). Dans cette hypothèse, il devrait y avoir un nombre non négligeable d'émergences multiples lorsque plusieurs femelles sont pondues sur le même hôte, résultant de la non rencontre des individus. A moins qu'un autre type de compétition se substitue alors aux combats (suppression physiologique par exemple), avec une quantité trop limitée de ressources pour permettre le développement de deux femelles. Cependant, ce phénomène n'a, à notre connaissance, jamais été observé chez *A. calandrae*. Une deuxième hypothèse pourrait être une plus faible agressivité des femelles envers les œufs qu'envers les larves ou bien à une incapacité à localiser les œufs avant leur éclosion. Dans ce cas, alors que les femelles n'évinceraient pas leurs compétitrices au stade œuf, elles s'élimineraient lors des combats larvaires, et un seul adulte émergerait de l'hôte lors de ces compétitions entre femelles. Une étude plus poussée de la compétition larvaire femelle / femelle pourrait nous donner des éléments de réponse.

Lors des différentes études que nous avons réalisées sur les combats larvaires, nous avons établi un lien entre ces asymétries (âge et sexe des œufs) et les stratégies de ponte mises en œuvre par les femelles. Nous avons ainsi montré que les femelles *A. calandrae* pondent préférentiellement sur des hôtes récemment parasités car ceux-ci confèrent à leurs descendants un meilleur taux de survie (Lebreton et al., 2009b). Jusqu'alors, seulement Goubault et al. (2003) avaient montré un tel lien, mais sur des intervalles de temps plus importants, englobant toute la période de développement du premier individu. Or, nos résultats montrent que chez *A. calandrae* la probabilité de survie du deuxième individu décroit considérablement entre le moment où le premier œuf est pondu et celui où il éclot, passant de 50 à 15%. Cette période est donc cruciale pour une femelle qui parvient par conséquent à distinguer des hôtes parasités par ces deux types d'œufs.

En ce qui concerne l'asymétrie dans l'aptitude à combattre des larves en fonction de leur sexe, nous avons également pu mettre en évidence que les femelles parasitoïdes adaptent également leurs stratégies de ponte (Lebreton et al., soumis). En effet, 28h après la première ponte, les femelles ont tendance à pondre plus sur des hôtes déjà parasités par des œufs femelles. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un œuf a moins de chance d'être éliminé avant sa propre éclosion par une larve femelle que par une larve mâle. De plus, les femelles *A. calandrae* adaptent le sexe de leurs œufs en fonction du sexe des œufs préalablement pondus. Toutefois, même si les femelles pondent plus de mâles quand des femelles sont déjà pondues à proximité, comme prédit par le modèle du « Sex Ratio Games » (Hamilton, 1967; Werren, 1980), elles évitent de les pondre sur les hôtes déjà parasités par des œufs femelles. Elles vont

ainsi éviter une compétition entre leurs fils et des femelles qui restent de meilleures compétitrices, augmentant ainsi leur fitness. L'adoption de telles stratégies démontre que les femelles sont capables de discriminer le sexe des œufs préalablement pondus par des femelles de la même espèce. Cette capacité de discrimination n'avait encore jamais été mise en évidence chez un parasitoïde. La seule étude qui, à notre connaissance, a testé cette hypothèse, n'a pas réussi à montrer un tel lien entre stratégie de ponte des femelles et sexe des œufs précédemment pondus (van Baaren et al., 1999). Or, nos résultats montrent clairement que les œufs doivent avoir atteint un certain stade de développement pour que les femelles parasitoïdes perçoivent leur sexe (Lebreton et al., soumis). En effet, dans notre cas, les femelles ne sont pas capables de discriminer le sexe des œufs deux heures après leur ponte. Dans leur étude, van Baaren et al (1999) présentaient aux femelles parasitoïdes des hôtes parasités depuis seulement une heure. Il est possible que cela explique en partie l'échec de la démonstration d'une discrimination sexuelle des œufs chez *Anaphes victus.*

Si nous avons pu déterminer le signal permettant aux femelles *A. calandrae* de discriminer des hôtes parasités depuis différents intervalles de temps, celui impliqué dans la reconnaissance du sexe des œufs reste inconnu. Il semble toutefois peu probable que ce signal provienne d'un marquage de ponte ou de l'évolution du profil cuticulaire de l'hôte. En effet, un marquage de ponte serait perceptible dès son dépôt. Or, les femelles ont besoin qu'un certain temps se soit écoulé avant de discriminer le sexe des œufs. Concernant l'évolution des hydrocarbures cuticulaires de l'hôte, ceci suppose que les femelles ajustent la composition de leur venin en fonction du sexe de l'œuf qu'elles pondent, et que l'hôte réagisse différemment en fonction de la nature des composés injectés ; ce qui est peu plausible. Il est donc probable que l'information provienne directement de l'œuf lui-même. Dans ce cas, nos résultats suggèrent que les œufs doivent atteindre un certain stade de développement pour que leur sexe soit perceptible par un autre parasitoïde. Dans nos tests de choix, lorsqu'une femelle pond un fils sur un hôte parasité par un œuf mâle, elle explore préalablement l'hôte parasité par un œuf femelle à l'aide de ses antennes avant de le rejeter. Ce rejet a lieu sans que la femelle n'insère son ovipositeur dans la gélule (observations personnelles). Si l'information est bien originaire de l'œuf, ceci signifierait qu'elle est détectée au niveau antennaire et par conséquent à distance, puisque la femelle ne peut pas entrer en contact direct avec l'œuf, celui-ci étant à l'intérieur de la gélule. Le signal permettant aux parasitoïdes de percevoir le sexe des œufs pourrait donc être de nature volatile.

Cette capacité à distinguer le sexe d'œufs pondus par d'autres individus n'avait jamais été démontrée chez les parasitoïdes et n'a été évoquée chez les insectes que dans de très rares

études. Chez la fourmi *Formica exsecta*, par exemple, les ouvrières manipulent le sex-ratio de la colonie en apportant une plus grande attention aux femelles ou bien directement en tuant les mâles pondus par la reine (Sundstrom et al., 1996). Cependant, aucune évidence ne montre clairement si cette distinction s'effectue au stade œuf ou aux premiers stades larvaires. Un résultat similaire à été trouvé chez l'abeille *Apis mellifera* mais il a été montré que la discrimination du sexe se faisait au stade larvaire à l'aide d'hydrocarbures cuticulaires (Sasaki et al., 2004). Toutefois, l'œuf peut lui-même être porteur d'informations, notamment concernant son origine maternelle, chez les insectes sociaux. Ainsi, chez les fourmis *Camponotus floridanus* (Endler et al., 2004) et *Formica fusca* (Helantera & Ratnieks, 2009) ou chez l'abeille *Apis mellifera* (Katzav-Gozansky et al., 2003) par exemple, les ouvrières sont capables de discriminer des œufs pondus par la reine ou d'autres ouvrières grâce à des composés chimiques présents à la surface de l'œuf. Bien que certaines substances pouvant être impliquées dans cette discrimination proviendraient d'un transfert de la mère à l'œuf au moment de la ponte (Endler et al., 2004), Katzav-Gozansky et al. (2003) ont montré que chez l'abeille, les deux types d'œufs variaient principalement dans leur profil au niveau de composés (essentiellement des méthyl-alcanes) absents de la glande de Dufour et donc probablement synthétisés par l'œuf lui-même. Ces méthyl-alcanes (C_{23} -C_{26}) sont retrouvés à la surface des œufs haploïdes mais sont absents de celle des œufs diploïdes. A l'inverse, certains esters sont, quant à eux, uniquement présents à la surface des œufs diploïdes. Contrairement aux alcanes, ces esters sont également présents dans la glande de Dufour des femelles. Une telle différence entre œufs haploïdes et diploïdes pourrait expliquer une discrimination entre œufs mâles et femelles, même si cette discrimination n'a jamais été établie chez l'abeille.

De nombreuses études se sont intéressées aux conséquences de la compétition sur le sex-ratio des pontes (Hamilton, 1967; Werren, 1983; King, 1992; Rabinovich et al., 2000; Debout et al., 2002; Santolamazza-Carbone & Cordero Rivera, 2003; Martel & Boivin, 2004; Shuker et al., 2004; Abe et al., 2005; West et al., 2005; Darrouzet et al., 2008). La plupart de ces études confirme la théorie de la Local Mate Competition (LMC) d'Hamilton (1967). Comme prédit par la LMC, lorsque le nombre de femelles présentes sur le patch de ponte augmente, une plus grande proportion de mâles est produite et le sex-ratio de ponte s'équilibre par conséquent aux alentours de 0,5. Cependant, cet ajustement du sex-ratio devrait dépendre de la structure de la population et plus particulièrement de la proportion de femelles vierges présentes. En effet, la LMC prédit une augmentation de la proportion de mâles produits par

chaque femelle dans le but d'inséminer les filles engendrées par les autres femelles. Or, si celles-ci sont vierges (ou mal inséminées), elles n'engendreront que des mâles. Auquel cas, les femelles accouplées n'auront pas intérêt à produire plus de fils étant donné qu'il n'y aura pas plus de femelles avec lesquelles s'accoupler à la génération suivante (Godfray, 1990). Cette prédiction a donné lieu à quelques études expérimentales et n'a, dans la plupart des cas, pas été vérifiée (King & D'Souza, 2004; Metzger et al., 2008). Cependant, en 2002, King a montré que les femelles *Spalangia endius* adaptent leur ponte en présence de compétitrices accouplées mais pas en présence de compétitrices vierges. Cette observation est similaire aux résultats que nous avons obtenus en compétition par exploitation. En effet, les femelles *A. calandrae* ajustent leur sex-ratio de ponte, mais uniquement lorsqu'elles sont en présence à la fois d'œufs mâles et femelles (Lebreton et al., soumis). Lorsqu'elles sont confrontées à des hôtes uniquement parasités par des œufs mâles, il n'y a pas de différence entre les sex-ratios produit sur les hôtes parasités et non parasités (Lebreton et al., 2009b). Ce résultat laisse penser que, si les femelles parasitoïdes sont capables d'adapter leur ponte en fonction du statut accouplé des compétitrices présentes, elles sont également capables de le faire en se basant sur le sexe des œufs qu'elles ont pondus lorsque l'exploitation du patch de ponte est asynchrone. De même, il a déjà été montré que la présence d'œufs préalablement pondus (Shuker & West, 2004; Darrouzet et al., 2008), tout comme la présence de compétitrices (Debout et al., 2002), avait la même conséquence sur les stratégies de ponte des parasitoïdes, à savoir une augmentation de proportion de fils produits. La compétition, qu'elle soit directe (par interférence) ou indirecte (par exploitation) pourrait ainsi se traduire par des adaptations similaires chez les parasitoïdes.

Des études antérieures ont montré que le sex-ratio de ponte produit par les femelles *A. calandrae* varie au cours de leur vie. Ainsi, si les femelles pondent majoritairement des filles au début de leur vie, à la fin, elles ont tendance à pondre une plus grande proportion de fils au fur et à mesure que leur réserve spermatique s'épuise (Do Thi Khanh, 2005). Ce phénomène a également été observé chez d'autres espèces telles que *Eupelmus orientalis* (Bressac & Chevrier, 1998) et *E. vuilleti* (Darrouzet et al., 2002). Cette contrainte pourrait affecter les stratégies de sélection des hôtes mises en évidence dans nos études. Ainsi, pour les femelles les plus âgées (tout comme pour les femelles vierges), il est préférable de pondre sur des hôtes non parasités. En effet, étant donné qu'elles ne pourront pondre que des œufs mâles sur des hôtes déjà parasités, leurs descendants auront peu de chances de remporter la compétition ; les mâles étant de moins bon compétiteurs que les femelles (Lebreton et al, soumis).

Les asymétries mises en évidence dans les combats larvaires au cours de ces études (notamment dans les capacités des larves des deux sexes à combattre), peuvent avoir également une importance considérable quant au sex-ratio de la population. En effet, les femelles ayant un avantage compétitif sur les mâles, le sex-ratio à l'émergence doit être biaisé en faveur des femelles par rapport au sex-ratio primaire dans les cas de superparasitisme. En effet, lorsque les femelles *A. calandrae* sont en population et que la compétition est importante (75 hôtes pour 25 femelles ou 150 hôtes pour 50 femelles), le sex-ratio observé dans la descendance est inférieur à celui prédit par la théorie de la Local Mate Compétition (environ 0,35 au lieu de 0,5) (Lanoue, 2008).

Les asymétries dans les combats larvaires ainsi que les stratégies de ponte que nous avons pu mettre en évidence au cours de ces différentes études sont donc des facteurs importants à prendre en considération pour une meilleure compréhension de l'évolution de la structure et du sex-ratio des populations d'*A. calandrae* en particulier, et des parasitoïdes solitaires en général.

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse ouvrent la voie à de nombreuses perspectives, notamment dans l'étude des mécanismes sous-jacents impliqués dans les comportements observés. Il sera ainsi intéressant à la fois d'identifier les signaux perçus par le parasitoïde et de comprendre comment cette perception peut être modulée et par quels facteurs. Nous pourrions ainsi tester les hypothèses énoncées au cours de cette discussion, à savoir, est-ce que les modifications du profil cuticulaire de l'hôte après parasitisme peuvent être à l'origine de la discrimination du statut parasité de celui-ci ? La paralysie, ou bien encore une baisse de production de CO_2 par l'hôte peuvent-elles être impliquées dans cette discrimination ? Et qu'en est-il pour la discrimination du sexe des œufs ? Il sera également intéressant de tester comment les différents signaux chimiques sont détectés au niveau antennaire et comment cette perception est modulée. S'agit-il d'une modulation centrale comme semble l'indiquer certaines études effectuées sur d'autres modèles ou bien s'agit-il d'une modulation au niveau du système nerveux périphérique ? Les différentes discriminations étudiées ici se font à distance et semblent donc impliquer le système antennaire. Mais l'ovipositeur pourrait également intervenir dans la perception de certaines substances. En effet, les femelles *A. calandrae* passent souvent de longues minutes à sonder l'intérieur de la gélule et la surface de l'hôte avant de le piquer (observation personnelle). L'étude fine de la structure de l'ovipositeur et des récepteurs olfactifs ou gustatifs qui pourraient s'y trouver permettrait de

donner des éléments de réponse. Jusqu'à présent, seuls les organes sensoriels présents sur les ovipositeurs d'espèces endoparasitoïdes ont été étudiés en détail (Quicke, 1997; Brown & Anderson, 1998; Consoli et al., 1999; van Lenteren et al., 2007).

En parallèle, une étude plus approfondie de l'effet du parasitisme sur le dysfonctionnement de la physiologie de l'hôte pourra amener à une meilleure compréhension des relations hôtes/ parasitoïdes et des mécanismes d'action du venin des parasitoïdes. Dans cette optique, il sera important d'identifier les différents constituants du venin du parasitoïde afin de mieux comprendre son mécanisme d'action. Il sera également intéressant de réaliser une cinétique des modifications métaboliques subies par l'hôte après parasitisme, tant au niveau cuticulaire qu'interne. Au niveau interne, une étude conjointe de la composition de l'hémolymphe et des tissus pourra nous permettre de savoir si les constituants qui disparaissent de l'hémolymphe après le parasitisme sont stockés ou non dans les tissus de l'hôte. Aussi, une étude plus fine basée sur un aspect qualitatif pourra nous permettre de mieux cibler l'impact réel de ces modifications sur la nutrition des femelles adultes.

Pour conclure, bien que ce travail s'inscrive clairement dans un contexte de recherche fondamentale, les résultats obtenus pourraient permettre la mise en place d'outils pour des applications dans la lutte biologique. Les résultats de ce travail de thèse permettent d'avoir une meilleure connaissance générale du comportement de ponte d'*A. calandrae*, ce qui est nécessaire pour une meilleure utilisation de l'espèce en lutte biologique. Les observations réalisées ici sur des femelles isolées face à des environnements de ponte calibrés et relativement simples pourront être utilisées, conjointement aux résultats d'autres études, dans des programmes de modélisations de systèmes complexes afin de mieux simuler l'impact de l'utilisation de parasitoïdes sur des populations d'hôtes. Ceci pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de l'utilisation d'ennemis naturels pour le contrôle des populations de ravageurs.

- BIBLIOGRAPHIE -

Abe, J., Kamimura, Y., Ito, H., Matsuda, H. & Shimada, M. 2003. Local mate competition with lethal male combat: effects of competitive asymmetry and information availability on a sex ratio game. *Journal of Evolutionary Biology*, **16,** 607-613.

Abe, J., Kamimura, Y. & Shimada, M. 2005. Individual sex ratios and offspring emergence patterns in a parasitoid wasp, *Melittobia australica* (Eulophidae), with superparasitism and lethal combat among sons. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57,** 366-373.

Abe, J., Kamimura, Y. & Shimada, M. 2007. Sex ratio schedules in a dynamic game: the effect of competitive asymmetry by male emergence order. *Behavioral Ecology*, **18,** 1106-1115.

Adéoti, R., Coulibaly, O. & Tamo, M. 2002. Facteurs affectant l'adoption des nouvelles technologies du niébé *Vigna unguiculata* en Afrique de l'Ouest. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*, **36,** 1-18.

Afsheen, S., Wang, X., Li, R., Zhu, C. S. & Lou, Y.-G. 2008. Differential attraction of parasitoids in relation to specificity of kairomones from herbivores and their by-products. *Insect Science*, **15,** 381-397.

Agboka, K., Schulthess, F., Chabi Olaye, A., Labo, I., Gounou, S. & Smith, H. 2002. Self-, intra-, and interspecific host discrimination in *Telenomus busseolae* Gahan and *T. isis* Polaszek (Hymenoptera: Scelionidae), sympatric egg parasitoids of the African cereal stem borer *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Behavior*, **15,** 1-12.

Ahmed, K. N., Pramanik, S. H. A., Nargis, A. & Khatun, M. 2006. Interspecific competition between *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Pteromalidae) and *Dinarmus basalis* (Rond.) (Pteromalidae) on *Callosobruchus chinensis* (L.). *Journal of Biosciences*, **14,** 103-106.

Ahmed, K. S. 1996. Studies on the ectoparasitoid, *Anisopteromalus calandrae* How. (Hymenoptera: Pteromalidae) as a biocontrol agent against the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominic*a (Fab.) in Saudi Arabia. *Journal of Stored Products Research*, **32,** 137-140.

Alleyne, M., Chappell, M. A., Gelman, D. B. & Beckage, N. E. 1997. Effects of parasitism by the Braconid wasp *Cotesia congregata* on metabolic rate in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, **43,** 143-154.

Anton, S., Dufour, M.-C. & Gadenne, C. 2007. Plasticity of olfactory-guided behaviour and its neurobiological basis: lessons from moths and locusts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123,** 1-11.

Ardeh, M. J., de Jong, P. W. & van Lenteren, J. C. 2005. Intra- and interspecific host discrimination in arrhenotokous and thelytokous *Eretmocerus spp*. *Biological Control*, **33,** 74-80.

Arrese, E. L., Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Pennington, J. E., Tsuchida, K. & Wells, M. A. 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31,** 7-17.

Arthur, B. J. & Hoy, R. R. 2006. The ability of the parasitoid fly *Ormia ochracea* to distinguish sounds in the vertical plane. *Journal of the Acoustical Society of America*, **120,** 1546-1549.

Barrera, J. F., Gomez, J. & Alauzet, C. 1994. Evidence for a marking pheromone in host discrimination by *Cephalonomia stephanoderis* (Hym, Bethylidae). *Entomophaga*, **39,** 363-366.

Barrozo, R. B. & Lazzari, C. R. 2004. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses*, **29,** 319-329.

Bartlelt, R. J., Cossé, A. A., Petroski, R. J. & Weaver, D. K. 2002. Cuticular hydrocarbons and novel alkenediol diacetates from wheat stem sawfly (*Cephus cinctus*): natural oxidation to pheromone components. *Journal of Chemical Ecology*, **28,** 385-405.

Bartlelt, R. J. & Jones, R. L. 1983. (Z)-10-Nonadecenal: A pheromonally active air oxidation product of (Z,Z)-9,19 dienes in yellow-headed spruce sawfly. *Journal of Chemical Ecology*, **9,** 1333-1342.

Beale, M. H., Birkett, M. A., Bruce, T. J. A., Chamberlain, K., Field, L. M., Huttly, A. K., Martin, J. L., Parker, R., Phillips, A. L., Pickett, J. A., Prosser, I. M., Shewry, P. R., Smart, L. E., Wadhams, L. J., Woodcock, C. M. & Zhang, Y. H. 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103,** 10509-10513.

Benedet, F., Leroy, T., Gauthier, N., Thibaudeau, C., Thibout, E. & Renault, S. 2002. Gustatory sensilla sensitive to protein kairomones trigger host acceptance by an endoparasitoid. *Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences*, **269,** 1879-1886.

Birkett, M. A., Campbell, C. A. M., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A. J., Martin, J. L., Matthes, M., Napier, J. A., Pettersson, J., Pickett, J. A., Poppy, G. M., Pow, E. M., Pye, B. J., Smart, L. E., Wadhams, G. H., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. 2000. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97,** 9329-9334.

Boivin, G. & van Baaren, J. 2000. The role of larval aggression and mobility in the transition between solitary and gregarious development in parasitoid wasps. *Ecology Letters*, **3,** 469-474.

Boomsma, J. J. & Franks, N. R. 2006. Social insects: from selfish genes to self organisation and beyond. *Trends in Ecology & Evolution*, **21,** 303-308.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72,** 248-254.

Bressac, C. & Chevrier, C. 1998. Offspring and sex ratio are independent of sperm management in *Eupelmus orientalis* females. *Journal of Insect Physiology*, **44,** 351-359.

Brown, P. E. & Anderson, M. 1998. Morphology and ultrastructure of sense organs on the ovipositor of *Trybliographa rapae*, a parasitoid of the cabbage root fly. *Journal of Insect Physiology*, **44,** 1017-1025.

Buckner, J. S. & Jones, W. A. 2005. Transfer of methyl-branched hydrocarbons from the parasitoid, Eretmocerus mundus, to silverleaf whitefly nymphs during oviposition.

Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, **140,** 59-65.

Burger, J. M. S., Hemerik, L., Lenteren, J. C. v. & Vet, L. E. M. 2004. Reproduction now or later: optimal host-handling strategies in the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Oikos*, **106,** 117-130.

Burger, J. M. S., Kormany, A., Lenteren, J. C. & Vet, L. E. M. 2005. Importance of host feeding for parasitoids that attack honeydew-producing hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **117,** 147-154.

Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E. & Wells, M. A. 2001. Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition*, **21,** 23-46.

Casas, J., Pincebourde, S., Mandon, N., Vannier, F., Poujol, R. & Giron, D. 2005. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology*, **86,** 545-554.

Casas, J., Vannier, F., Mandon, N., Delbecque, J. P., Giron, D. & Monge, J. P. 2009. Mitigation of egg limitation in parasitoids: immediate hormonale response and enhanced oogenesis after host use. *Ecology*, **90,** 537-545.

Castillo, A., Infante, F., Vera Graziano, J. & Trujillo, J. 2004. Host-discrimination by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of the coffee berry borer. *Biocontrol*, **49,** 655-663.

Charnov, E. L. 1976a. Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theoretical Population Biology*, **9,** 129-136.

Charnov, E. L. 1976b. Optimal foraging: Attack strategies of a mantid. *The American Naturalist*, **110,** 141-151.

Charnov, E. L. 1982. *The theory of sex allocation*. Princeton: Princeton University Press.

Charnov, E. L., Los-Denhartogh, R. L., Jones, W. T. & Van den Assem, J. 1981. Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature*, **289,** 27-33.

Choi, W. I., Yoon, T. J. & Ryoo, M. I. 2001. Host-size-dependent feeding behaviour and progeny sex ratio of *Anisopteromalus calandrae* (Hym., Pteromalidae). *Journal of Applied Entomology*, **125,** 71-77.

Colazza, S., Aquila, G., De Pasquale, C., Peri, E. & Millar, J. 2007. The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses n -nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts. *Journal of Chemical Ecology*, **33,** 1405-1420.

Colazza, S., Salerno, G. & Wajnberg, E. 1999. Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control*, **16,** 310-317.

Collier, T. R. 1995. Host feeding, egg maturation, resorption, and longevity in the parasitoid *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **88,** 206-214.

Collier, T. R., Murdoch, W. W. & Nisbet, R. M. 1994. Egg load and the decision to host-feed in the parasiotoid, *Aphytis melinus*. *Journal of Animal Ecology*, **63,** 299-306.

Consoli, F. L., Kitajima, E. W. & Parra, J. R. 1999. Sensilla on the antenna and ovipositor of the parasitic wasps *trichogramma galloi Zucchi* and *T. pretiosum Riley* (Hym.,Trichogrammatidae). *Microscopy Research and Technique*, **45,** 313-324.

Contreras-Garduno, J., Cordoba-Aguilar, A., Lanz-Mendoza, H. & Rivera, A. C. 2009. Territorial behaviour and immunity are mediated by juvenile hormone: the physiological basis of honest signalling? *Functional Ecology*, **23,** 157-163.

Cook, L. M. 2000. Changing views on melanic moths. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69,** 431-441.

Cook, L. M., Mani, G. S. & Varley, M. E. 1986. Postindustrial melanism in the peppered moth. *Science*, **231,** 611-613.

Cox, F. E. G. 1970. Changes in the composition of host haemolymph after attack by an insect parasitoid. *Nature*, **227,** 191-192.

Danchin, E., Giraldeau, L.-A. & Cézilly, F. 2005. *Ecologie comportementale*. Dunod.

Darrouzet, E., Bignon, L. & Chevrier, C. 2007. Impact of mating status on egg-laying and superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123,** 279–285.

Darrouzet, E., Boivin, G. & Chevrier, C. 2008. Sex allocation decision under superparasitism by the parasitoid wasp *Eupelmus vuilleti*. *Journal of Insect Behavior*, **21,** 181-191.

Darrouzet, E., Huignard, J. & Chevrier, C. 2002. Effect of differential host exposure on reproduction in the solitary ectoparasitoid *Eupelmus vuilleti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **103,** 73-81.

Darrouzet, E., Imbert, E. & Chevrier, C. 2003. Self-superparasitism consequences for offspring sex ratio in the solitary ectoparasitoid *Eupelmus vuilleti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **109,** 167-171.

Dawkins, R. 1976. *The selfish gene*. Oxford: Oxford University Press.

Debout, G., Fauvergue, X. & Fleury, F. 2002. The effect of foundress number on sex ratio under partial local mate competition. *Ecological Entomology*, **27,** 242-246.

Djemai, I., Casas, J. & Magal, C. 2004. Parasitoid foraging decisions mediated by artificial vibrations. *Animal Behaviour*, **67,** 567-571.

Do Thi Khanh, H. 2005. *Anisopteromalus calandrae* : Un modèle pour l'étude du succès reproducteur des mâles. *Thèse de Doctorat*, 152 pages. Université de Tours, France.

Do Thi Khanh, H., Bressac, C. & Chevrier, C. 2005. Male sperm donation consequences in single and double matings in *Anisopteromalus calandrae*. *Physiological Entomology*, **30,** 29-35.

Doury, G., Bigot, Y. & Periquet, G. 1997. Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary sacretions of the ectoparasitoid was *Eupelmus orientalis*. *Journal of Insect Physiology*, **43,** 69-81.

Doury, G., Rojas-Rousse, D. & Periquet, G. 1995. Ability of *Eupelmus orientalis* ectoparasitoid larvae to develop on an unparalysed host in the absence of female stinging behaviour. *Journal of Insect Physiology*, **41,** 287-296.

Du, Y. J., Poppy, G. M., Powell, W., Pickett, J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology*, **24,** 1355-1368.

Elner, R. W. & Hughes, R. N. 1978. Energy maximization in the diet of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Animal Ecology*, **47,** 103-116.

Endler, A., Liebig, J., Schmitt, T., Parker, J. E., Jones, G. R., Schreier, P. & Holldobler, B. 2004. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social

insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101,** 2945-2950.

Faucher, C., Forstreuter, M., Hilker, M. & de Bruyne, M. 2006. Behavioral responses of Drosophila to biogenic levels of carbon dioxide depend on life-stage, sex and olfactory context. *Journal of Experimental Biology*, **209,** 2739-2748.

Ferracini, C., Boivin, G. & Alma, A. 2006. Costs and benefits of host feeding in the parasitoid wasp *Trichogramma turkestanica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **121,** 229-234.

Field, S. A., Calbert, G. & Keller, M. A. 1998. Patch defence in the parasitoid wasp *Trissolcus basalis* (Insecta: Scelionidae): The time structure of pairwise contests, and the "waiting game". *Ethology*, **104,** 821-840.

Fink, U. & Völkl, W. 1995. The effect of abiotic factors on foraging and oviposition success of the aphid parasitoid, *Aphidius rosae*. *Oecolgia*, **103,** 371-378.

Fisher, R. A. 1958. *The Genetical Theory of Natural Selection*. New York: Dover.

Forsyth, A. & Montgomerie, R. D. 1987. Alternative reproductive tactics in the territorial damselfly *Calopteryx maculata*: sneaking by older males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **21,** 73-81.

Fretwell, S. D. 1972. *Population in a seasonal environment*. Princeton: Princeton University Press.

Fuchsberg, J. R., Yong, T.-H., Losey, J. E., Carter, M. E. & Hoffmann, M. P. 2007. Evaluation of corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis*; Homoptera: Aphididae) honeydew as a food source for the egg parasitoid *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biological Control*, **40,** 230-236.

Fulton, B. B. 1933. Notes on *Habrocytus cerealellae*, a parasite of Angourmois grain moth. *Annals of the entomology society of America*, **26,** 536-553.

Gauthier, N. 1996. Étude d'un ectoparasitoïde solitaire *Dinarmus basalis* (Hym. Pteromalidae) en situation de compétition intra- et interspécifique : activité reproductrive et réponses comportementales. *Thèse de Doctorat*, 183 pages. Université de Tours, France.

Gauthier, N. & Monge, J. P. 1999. Could the egg itself be the source of the oviposition deterrent marker in the ectoparasitoid *Dinarmus basalis*? *Journal of Insect Physiology*, **45,** 393-400.

Gauthier, N., Monge, J. P. & Huignard, J. 1996. Superparasitism and host discrimination in the solitary ectoparasitoid *Dinarmus basalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **79,** 91-99.

Gauthier, N., Sanon, A., Monge, J. P. & Huignard, J. 1999. Interspecific relations between two sympatric species of hymenoptera, *Dinarmus basalis* (Rond) and *Eupelmus vuilleti* (Crw), ectoparasitoids of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (F). *Journal of Insect Behavior*, **12,** 399-413.

Ghimire, M. N. & Phillips, T. W. 2008. Effects of prior experience on host selection and host utilization by two populations of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*, **37,** 1300-1306.

Giron, D. & Casas, J. 2003. Mothers reduce egg provisioning with age. *Ecology Letters*, **6,** 273-277.

Giron, D., Pincebourde, S. & Casas, J. 2004. Lifetime gains of host-feeding in a synovigenic parasitic wasp. *Physiological Entomology*, **29,** 436-442.

Giron, D., Rivero, A., Mandon, N., Darrouzet, E. & Casas, J. 2002. The physiology of host feeding in parasitic wasps: implications for survival. *Functional Ecology*, **16,** 750-757.

Godfray, H. C. J. 1990. The causes and consequences of constrained sex allocation in haplodiploid animals. *Journal of Evolutionary Biology*, **3,** 3-17.

Godfray, H. C. J. 1994. *Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Goubault, M. 2003. Exploitation des hôtes chez un Hyménoptère parasitoïde solitaire : conséquences adaptatives de la compétition intraspécifique sur les stratégies comportementales des femelles. *Thèse de Doctorat*, 196 pages. Université de Rennes 1, France.

Goubault, M., Krespi, L., Boivin, G., Poinsot, D., Nenon, J. P. & Cortesero, A. M. 2004. Intraspecific variations in host discrimination behavior in the pupal parasitoid *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*, **33,** 362-369.

Goubault, M., Outreman, Y., Poinsot, D. & Cortesero, A. M. 2005. Patch exploitation strategies of parasitic wasps under intraspecific competition. *Behavioral Ecology*, **16,** 693-701.

Goubault, M., Plantegenest, M., Poinsot, D. & Cortesero, A. M. 2003. Effect of expected offspring survival probability on host selection in a solitary parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **109,** 123-131.

Goubault, M., Scott, D. & Hardy, I. C. W. 2007. The importance of offspring value: maternal defence in parasitoid contests. *Animal Behaviour*, **74,** 437-446.

Govind, S., Melk, J. P. & Morales, J. 2000. Developmental arrest and physical entrapment eliminates supernumerary *Ganaspis xanthopoda* parasitoids in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Parasitology*, **86,** 463-470.

Greenfield, M. D. & Baker, M. 2003. Bat avoidance in non-aerial insects: the silence response of signaling males in an acoustic moth. *Ethology*, **109,** 427-442.

Greig, E. I. & Greenfield, M. D. 2004. Sexual selection and predator avoidance in an acoustic moth: Discriminating females take fewer risks. *Behaviour*, **141,** 799-815.

Gu, H. & Dorn , S. 2001. How do wind velocity and light intensity influence host-location success in *Cotesia glomerata* (Hym., Braconidae)? *Journal of Applied Entomology*, **125,** 115-120.

Haas, W., Stiegeler, P., Keating, A., Kullmann, B., Rabenau, H., Schönamsgruber, E. & Haberl, B. 2002. *Diplostomum spathaceum cercariae* respond to a unique profile of cues during recognition of their fish host. *International Journal for Parasitology*, **32,** 1145-1154.

Haccou, P. & van Alphen, J. J. M. 2008. Competition and asymmetric wars of attrition in insect parasitoids. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field applications* (Ed. by Wajnberg, E., Bernstein, C. & van Alphen, J. J. M.), pp. 193-211: Blackwell Publishing Ltd.

Hamilton, W. D. 1964. The genetical evolution of social behaviour I & II. *Journal of Theoretical Biology*, **7,** 1-52.

Hamilton, W. D. 1967. Extraordinary sex ratios. *Science*, **156,** 477-488.

Harvey, I. F. 1994. Strategies of behaviour. In: *Behaviour and evolution* (Ed. by Slater, P. J. B. & Halliday, T. R.), pp. 106-149: Cambridge University Press.

Hegazi, E. M., Abd El-Aziz, G. M., El-Shazly, A. Y. & Khafagi, W. E. 2007. Influence of host age and host deprivation on longevity, egg load dynamics and oviposition rate in *Microplitis rufiventris*. *Insect Science*, **14,** 485-495.

Heimpel, G. E. & Rosenheim, J. A. 1995. Dynamic host feeding by the parasitoid *Aphytis melinus*: the balance between current and future reproduction. *Journal of Animal Ecology*, **64,** 153-167.

Heimpel, G. E., Rosenheim, J. A. & Adams, J. M. 1994. Behavioral ecology of host feeding in *Aphytis melinus* parasitoids. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, **6,** 101-115.

Heimpel, G. E., Rosenheim, J. A. & Kattari, D. 1997. Adult feeding and lifetime reproductive success in the parasitoid *Aphytis melinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **83,** 305-315.

Helantera, H. & Ratnieks, F. L. W. 2009. Two independent mechanisms of egg recognition in worker *Formica fusca* ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **63,** 573-580.

Herre, E. A. 1985. Sex ratio adjustment in fig wasps. *Science*, **228,** 896-898.

Herre, E. A. 1987. Optimality, plasticity and selective regime in fig wasp sex ratios. *Nature*, **329,** 627-629.

Hilker, M. & McNeil, J. 2008. Chemical and behavioral ecology. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field applications* (Ed. by Wajnberg, E., Bernstein, C. & van Alphen, J. J. M.), pp. 92-113: Blackwell Publishing Ltd.

Hoffmeister, T. S. 2000. Marking decisions and host discrimination in a parasitoid attacking concealed hosts. *Canadian Journal of Zoology*, **78,** 1494-1499.

Hoffmeister, T. S. & Roitberg, B. D. 1997. To mark the host or the patch: Decision of a parasitoid searching for concealed host larvae. *Evolutionary Ecology*, **11,** 145-168.

Hogervorst, P. A. M., Wäckers, F. L. & Romeis, J. 2007. Effects of honeydew sugar composition on the longevity of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **122,** 223-232.

Howard, R. W. 2001. Cuticular hydrocarbons of adult *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae) and two larval hosts, angoumois grain moth (Lepidoptera: Gelechiidae) and cowpea weevil (Coleptera: Bruchidae). *Annals of the Emtomological Society of America*, **94,** 152-158.

Howard, R. W. & Baker, J. E. 2003. Morphology and chemistry of Dufour glands in four ectoparasitoids: *Cephalonomia tarsalis*, *C. waterstoni* (Hymenoptera: Bethylidae), *Anisopteromalus calandrae*, and *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **135,** 153-167.

Howard, R. W. & Blomquist, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, **50,** 371-393.

Hubbard, S. F., Harvey, I. F. & Fletcher, J. P. 1999. Avoidance of superparasitism: a matter of learning? *Animal Behaviour*, **57,** 1193-1197.

Hubbard, S. F., Marris, G., Reynolds, A. & Rowe, G. W. 1987. Adaptive patterns in the avoidance of superparasitism by solitary parasitic wasps. *Journal of Animal Ecology*, **56,** 387-401.

Ignell, R., Couillaud, F. & Anton, S. 2001. Juvenile-hormone-mediated plasticity of aggregation behaviour and olfactory processing in adult desert locusts. *Journal of Experimental Biology*, **204,** 249-259.

Inoue, M. & Endo, T. 2008. Below-ground host location by *Campsomeriella annulata* (Hymenoptera: Scoliidae), a parasitoid of scarabaeid grubs. *Journal of Ethology*, **26,** 43-50.

Islam, K. S. & Copland, M. J. W. 2000. Influence of egg load and oviposition time interval on the host discrimination and offspring survival of *Anagyrus pseudococci* (Hymenoptera: Encyrtidae), a solitary endoparasitoid of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research*, **90,** 69-75.

Islam, W. & Nargis, A. 1994. Control of the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (L.), in warehouse by a parasitoid, *Anisopteromalus calandrae* (How.). *International Pest Control*, **36,** 72-73,76.

Ito, E. & Yamada, Y. Y. 2007. Imperfect preference for singly parasitized hosts over doubly parasitized hosts in the semisolitary parasitoid *Echthrodelphax fairchildii*: implications for profitable self-superparasitism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123,** 207-215.

Jaloux, B., Errard, C., Mondy, N., Vannier, F. & Monge, J. 2005. Sources of chemical signals which enhance multiparasitism preference by a cleptoparasitoid. *Journal of Chemical Ecology*, **31,** 1325 - 1337.

Janssen, A., van Alphen, J. J. M., Sabelis, M. W. & Bakker, K. 1995a. Odor-mediated avoidance of competition in Drosophila parasitoids - The ghost of competition. *Oikos*, **73,** 356-366.

Janssen, A., van Alphen, J. J. M., Sabelis, M. W. & Bakker, K. 1995b. Specificity of odour-mediated avoidance of competition in Drosophila parasitoids. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **36,** 229-235.

Jassim, O., Huang, Z. Y. & Robinson, G. E. 2000. Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *Journal of Insect Physiology*, **46,** 243-249.

Jervis, M. A. & Copland, M. J. W. 1996. The life cycle. In: *Insect natural enemies:practical approaches to their study and evaluation* (Ed. by Jervis, M. A. & Kidd, N. A. C.), pp. 63-161. London.

Jervis, M. A. & Kidd, N. A. C. 1986. Host-feeding strategies in Hymenopteran parasitoids. *Biological Reviews*, **61,** 395-434.

Johnson, S. N. & Gregory, P. J. 2006. Chemically-mediated host-plant location and selection by root-feeding insects. *Physiological entomology*, **31,** 1-13.

Kalmes, R., Ndoutoume, A. & Rojas-Rousse, D. 1999. Facultative hyperparasitism in the hymenoptera *Eupelmus orientalis* (Hymenoptera: Eupelmidae) in a populations cage. *Annales de la Societé Entomologique de France*, **35,** 397-403.

Katzav-Gozansky, T., Soroker, V., Kamer, J., Schulz, C. M., Francke, W. & Hefetz, A. 2003. Ultrastructural and chemical characterization of egg surface of honeybee worker and queen-laid eggs. *Chemoecology*, **13,** 129-134.

Kidd, N. A. C. & Jervis, M. A. 1991. Host-feeding and oviposition by parasitoids in relation to host stage - consequences for parasitoid-host population dynamics. *Researches on Population Ecology*, **33,** 87-99.

King, B. H. 1987. Offspring sex ratios in parasitoid wasps. *The Quarterly Review of Biology*, **62,** 367-396.

King, B. H. 1992. Sex ratios of the wasp *Nasonia vitripennis* from self- versus conspecifically-parasitized hosts: local mate competition versus host quality models. *Journal of Evolutionary Biology*, **5,** 445-455.

King, B. H. 2002. Sex ratio response to conspecifics in a parasitoid wasp: test of a prediction of local mate competition theory and alternative hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **52,** 17-24.

King, B. H. & D'Souza, J. A. 2004. Effects of constrained females on offspring sex ratios of *Nasonia vitripennis* in relation to local mate competition theory. *Canadian Journal of Zoology*, **82,** 1969-1974.

Kitch, L. W. & Ntoukam, G. Bulletin technique 3 du CRSP: Airtight storage of cowpea in triple plastic bags (Triple bagging). Institut de recherche agronomique du Cameroun.

Kohler, S. L. & McPeek, M. A. 1989. Predation risk and the foraging behavior of competing stream insects. *Ecology*, **70,** 1811-1825.

Komdeur, J., Daan, S., Tinbergen, J. & Mateman, C. 1997. Extreme adaptive modification in sex ratio of the Seychelles warbler's eggs. *Nature*, **385,** 522-525.

Krebs, J. R. & Davies, N. B. 1993. *An introduction to behavioural ecology*. Oxford: Blackwell scientific publications LTD.

Krebs, J. R. & Davies, N. B. 1997. The evolution of behavioural ecology. In: *Behavioural ecology: an evolutionary approach* (Ed. by Krebs, J. R. & Davies, N. B.), pp. 3-12: Wiley-Blackwell.

Krivan, V. 1997. Dynamical consequences of optimal host feeding on host-parasitoid population dynamics. *Bulletin of Mathematical Biology*, **59,** 809-831.

Kroder, S., Samietz, J. & Dorn , S. 2007. Temperature affects interaction of visual and vibrational cues in parasitoid host location. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, **193,** 223-231.

Kumazaki, M., Matsuyama, S., Suzuki, T., Kuwahara, Y. & Fujii, K. 2000. Parasitic wasp, *Dinarmus basalis*, utilizes oviposition-marking pheromone of host azuki bean weevils as host-recognizing kairomone. *Journal of Chemical Ecology*, **26,** 2677-2695.

Lacoume, S., Bressac, C. & Chevrier, C. 2006. Effect of host size on male fitness in the parasitoid wasp *Dinarmus basalis*. *Journal of Insect Physiology*, **52,** 249-254.

Lanoue, G. 2008. Influence de la compétition intraspécifique sur la descendance d'*Anisopteromalus calandrae*. *Mémoire de Master 1*, 22 pages. Université François Rabelais, Tours, France.

Le Ralec, A. & Wajnberg, E. 1990. Sensory receptors of the ovipositor of *Trichogramma maidis* (Hym.: Trichogrammatidae). *Entomophaga*, **35,** 293-299.

Lebreton, S., Christidès, J.-P., Bagnères, A.-G. & Darrouzet, E. in prep. Modification of the chemical profile of hosts after parasitism allow parasitoid females to assess the time elapsed since the first attack.

Lebreton, S., Darrouzet, E. & Chevrier , C. 2009a. Could hosts considered as low quality for egg-laying be considered as high quality for host-feeding? *Journal of Insect Physiology*, **55,** 694-699.

Lebreton, S., Darrouzet, E. & Chevrier , C. soumis. Sex allocation strategies in response to conspecifics offspring sex ratio in solitary parasitoids.

Lebreton, S., Labarussia, M., Chevrier, C. & Darrouzet, E. 2009b. Discrimination of the age of conspecific eggs by an ovipositing ectoparasitic wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **130,** 28-34.

Lehman, G. U. C. & Heller, K. G. 1998. Bushcricket song structure and predation by the acoustically orienting parasitoid fly *Therobia leonidei* (Diptera: Tachinidae: Ormiini). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **43,** 239-245.

Mackauer, M. & Sequeira, R. 1993. Patterns of development in insect parasites. In: *Parasites and pathogens of insects* (Ed. by Beckage, N. E., Thompson, S.N.& Federici, B.A.), pp. 1-23. New York: Academic Press.

Mahmoud, A. M. A. & Lim, U. T. 2008. Host discrimination and interspecific competition of *Trissolcus nigripedius* and *Telenomus gifuensis* Hymenoptera: Scelionidae), sympatric parasitoids of *Dolycoris baccarum* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological control*, **45,** 337-343.

Mangel, M. & Clark, C. W. 1988. *Dynamic modeling in behavioral ecology*. Princeton: Princeton University Press.

Marris, G. C., Hubbard, S. F. & Scrimgeour, C. 1996. The perception of genetic similarity by the solitary parthenogenetic parasitoid *Venturia canescens*, and its effects on the occurrence of superparasitism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **78,** 167-174.

Martel, V. & Boivin, G. 2004. Impact of competition on sex allocation by Trichogramma. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **111,** 29-35.

Mattiacci, L., Hutter, E. & Dorn , S. 1999. Host location of *Hyssopus pallidus*, a larval parasitoid of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Biological Control*, **15,** 241-251.

Mayhew, P. J. 1997. Fitness consequences of ovicide in a parasitoid wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **84,** 115-126.

Mayhew, P. J. 1998. The evolution of gregariousness in parasitoid wasps. *Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences*, **265,** 383-389.

Mayhew, P. J. & Hardy, I. C. W. 1998. Nonsiblicidal behavior and the evolution of clutch size in Bethylid wasps. *The American Naturalist*, **151,** 409-424.

Maynard Smith, J. 1974. The theory of games and the evolution of animal conflicts. *Journal of Theoretical Biology*, **47,** 209-221.

Maynard Smith, J. 1982. *Evolution and the theory of games*. Cambridge, MA: Cambridge University Press.

McGregor, R. 1997. Host-feeding and oviposition by parasitoids on hosts of different fitness value: Influences of egg load and encounter rate. *Journal of Insect Behavior*, **10,** 451-462.

Mehrnejad, M. R. & Copland, M. J. W. 2007. Host discrimination by the endoparasitoid *Psyllaephagus pistaciae* (Hymenoptera: Encyrtidae): A case of time-dependent ability. *Biocontrol Science and Technology*, **17,** 401-411.

Meiners, T., Köpf, A., Stein, C. & Hilker, M. 1997. Chemical signals mediating interactions between *Galeruca tanaceti* L. (Coleoptera, Chrysomelidae) and its egg parasitoid *Oomyzus galerucivorus* (Hedqvits) (Hymenoptera, Eulophidae). *Journal of Insect Behavior*, **10,** 523-539.

Metzger, M., Bernstein, C. & Desouhant, E. 2008. Does constrained oviposition influence offspring sex ratio in the solitary parasitoid wasp *Venturia canescens*? *Ecological Entomology*, **33,** 167-174.

Meyhöfer, R. & Casas, J. 1999. Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *Journal of Insect Physiology*, **45,** 967-971.

Mondy, N., Corio-Costet, M.-F., Bodin, A., Mandon, N., Vannier, F. & Monge, J.-P. 2006. Importance of sterols acquired through host feeding in synovigenic parasitoid oogenesis. *Journal of Insect Physiology*, **52,** 897-904.

Moreau, S. J. M. & Guillot, S. 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35,** 1209-1223.

Nakamatsu, Y. & Tanaka, T. 2003. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus sp*. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. *Journal of Insect Physiology*, **49,** 149-159.

Nakamatsu, Y. & Tanaka, T. 2004. Venom of *Euplectrus separatae* causes hyperlipidemia by lysis of host fat body cells. *Journal of Insect Physiology*, **50,** 267-275.

Netting, J. F. & Hunter, M. S. 2000. Ovicide in the whitefly parasitoid, *Encarsia formosa*. *Animal Behaviour*, **60,** 217-226.

NgiSong, A. J., Overholt, W. A., Njagi, P. G. N., Dicke, M., Ayertey, J. N. & Lwande, W. 1996. Volatile infochemicals used in host and host habitat location by *Cotesia flavipes* cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on graminae. *Journal of Chemical Ecology*, **22,** 307-323.

Nishimura, K. & Jahn, G. 1996. Sex allocation of three solitary ectoparasitic wasp species on bean weevil larvae: Sex ratio change with host quality and local mate competition. *Journal of Ethology*, **14,** 27-33.

Okuda, T. & Ceryngier, P. 2000. Host discrimination in *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae), a solitary parasitoid of coccinellid beetles. *Applied Entomology and Zoology*, **35,** 535-539.

Onodera, J., Matsuyama, S., Suzuki, T. & Fujii, K. 2002. Host-recognizing kairomones for parasitic wasp, *Anisopteromalus calandrae*, from larvae of azuki dean weevil, *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Chemical Ecology*, **28,** 1209-1220.

Oster, G. F. & Wilson, E. O. 1979. *Caste and ecology in the social insects*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Outreman, Y., Le Ralec, A., Plantegenest, M., Chaubet, B. & Pierre, J. S. 2001. Superparasitism limitation in an aphid parasitoid: cornicle secretion avoidance and host discrimination ability. *Journal of Insect Physiology*, **47,** 339-348.

Parker, G. A. & Stuart, R. A. 1976. Animal behaviour as a strategy optimizer: evolution of ressource assessment strategies and optimal emigration thresholds. *The American Naturalist*, **110,** 1055-1076.

Perez-Lachaud, G., Batchelor, T. P. & Hardy, I. C. W. 2004. Wasp eat wasp: facultative hyperparasitism and intra-guild predation by bethylid wasps. *Biological Control*, **30,** 149-155.

Peri, S., Sole, M. A., Wajnberg, E. & Colazza, S. 2006. Effect of host kairomones and oviposition experience on the arrestment behavior of an egg parasitoid. *Journal of Experimental Biology*, **209,** 3629-3635.

Petersen, G. & Hardy, I. C. W. 1996. The importance of being larger: parasitoid intruder–owner contests and their implications for clutch size. *Animal Behaviour*, **51,** 1363-1373.

Petitt, F. L., Turlings, T. C. J. & Wolf, S. P. 1992. Adult experience madifies attraction of the leafminer parasitoid *Opius dissitus* (Hymenoptera, braconidae) to volatile semiochemicals. *Journal of Insect Behavior*, **5,** 623-634.

Pexton, J. J. & Mayhew, P. J. 2001. Immobility: the key to family harmony? *Trends in Ecology & Evolution*, **16,** 7-9.

Pexton, J. J., Rankin, D. J., Dytham, C. & Mayhew, P. J. 2003. Asymmetric larval mobility and the evolutionary transition from siblicide to nonsiblicidal behavior in parasitoid wasps. *Behavioral Ecology*, **14,** 182-193.

Phillips, D. S. 1993. Host-feeding and egg maturation by *Pachycrepoideus vindemia*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **69,** 75-82.

Pickett, J. A., Wadhams, L. J., Woodcock, C. M. & Hardie, J. 1992. The chemical ecology of Aphids. *Annual Review of Entomology*, **37,** 67-90.

Pupedis, R. J. 1978. Tube feeding by *Sisyridivora cavigena* (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Climacia areolaris* (Neuroptera: Sisyridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **71,** 773-775.

Quicke, D. L. J. 1997. *Parasitic wasps*. London: Chapman & Hall.

Rabinovich, J. E., Jorda, M. T. & Bernstein, C. 2000. Local mate competition and precise sex ratios in *Telenomus fariai* (Hymenoptera : Scelionidae), a parasitoid of triatomine eggs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **48,** 308-315.

Rivero, A., Giron, D. & Casas, J. 2001. Lifetime allocation of juvenile and adult nutritional resources to egg production in a holometabolous insect. *Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences*, **268,** 1231-1237.

Rivero, A. & West, S. A. 2005. The costs and benefits of host feeding in parasitoids. *Animal Behaviour*, **69,** 1293-1301.

Rivers, D. B. & Denlinger, D. L. 1995. Venom-induced alterations in fly lipid metabolism and its impact on larval development of the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **66,** 104-110.

Roitberg, B. D. & Mangel, M. 1988. On the evolutionary ecology of marking pheromones. *Evolutionary Ecology*, **2,** 289-315.

Rojas-Rousse, D., Bressac, C., Thibeaudeau, C., Kalmès, R., Darrouzet, E. & Chevrier , C. 2005. Capacité de reproduction des femelles *Eupelmus vuilleti* (Eupelmidae),

inséminées par des mâles développés en hyperparasitoïdes de *Dinarmus basalis* (Pteromalidae). *Comptes Rendus Biologies*, **328,** 802-811.

Rosenheim, J. A., Heimpel, G. E. & Mangel, M. 2000. Egg maturation, egg resorption and the costliness of transient egg limitation in insects. *Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences*, **267,** 1565-1573.

Rostas, M. & Wölfling, M. 2009. Caterpillar footprints as host location kairomones for *Cotesia marginiventris*: persistence and chemical nature. *Journal of Chemical Ecology*, **35,** 20-27.

Rovero, F., Hughes, R. N. & Chelazzi, G. 2000. When time is of the essence: choosing a currency for prey-handling costs. *Journal of Animal Ecology*, **69,** 683-689.

Saïd, I., Gaertner, C., Renou, M. & Rivault, C. 2005. Perception of cuticular hydrocarbons by the olfactory organs in *Periplaneta americana* (L.) (Insecta: Dictyoptera). *Journal of Insect Physiology*, **51,** 1384-1389.

Salt, G. 1961. Competition among insect parasitoids. Mechanisms in biological competition. *Symposium of the Society for Experimental Biology*, **15,** 96-119.

Salvador, G. & Cônsoli, F. L. 2008. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, **45,** 103-110.

Santolamazza Carbone, S., Pestana Nieto, M. & Cordero Rivera, A. 2008. Egg resorption behaviour by the solitary egg parasitoid *Anaphes nitens* under natural conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **127,** 191-198.

Santolamazza-Carbone, S. & Cordero Rivera, A. 2003. Superparasitism and sex ratio adjustment in a wasp parasitoid: results at variance with Local Mate Competition? *Oecologia*, **136,** 365 - 373.

Santolamazza-Carbone, S., Rodriguez-Illamola, A. & Cordero Rivera, A. 2004. Host finding and host discrimination ability in *Anaphes nitens* Girault, an egg parasitoid of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. *Biological Control*, **29,** 24-33.

Sasaki, K., Kitamura, H. & Obara, Y. 2004. Discrimination of larval sex and timing of male brood elimination by workers in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Applied Entomology and Zoology*, **39,** 393-399.

Schroeder, R. & Hilker, M. 2008. The relevance of background odor in resource location by insects: A behavioral approach. *Bioscience*, **58,** 308-316.

Schwörer, U. & Völkl, W. 2001. Foraging behavior of *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) at different spatial scales: resource utilization and suboptimal weather conditions. *Biological control*, **21,** 111-119.

Segura, D. F., Caceres, C., Vera, M. T., Wornoayporn, V., Islam, A., Teal, P. E. A., Cladera, J. L., Hendrichs, J. & Robinson, A. S. 2009. Enhancing mating performance after juvenile hormone treatment in *Anastrepha fraterculus*: a differential response in males and females acts as a physiological sexing system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **131,** 75-84.

Segura, D. F., Viscarret, M. M., Carabajal Paladino, L. Z., Ovruski, S. M. & Cladera, J. L. 2007. Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. *Animal Behaviour*, **74,** 131-142.

Shuker, D. & West, S. 2004. Information constraints and the precision of adaptation: Sex ratio manipulation in wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101,** 10363-10367.

Shuker, D. M., Pen, I., Duncan, A. B., Reece, S. E. & West, S. A. 2005. Sex ratios under asymmetrical Local Mate Competition: theory and a test with parasitoid wasps. *The American Naturalist*, **166,** 301-316.

Shuker, D. M., Pen, I. & West, S. A. 2006. Sex ratios under asymmetrical local mate competition in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Behavioral Ecology*, **17,** 345-352.

Shuker, D. M., Reece, S. E., Taylor, J. A. L. & West, S. A. 2004. Wasp sex ratios when females on a patch are related. *Animal Behaviour*, **68,** 331-336.

Sirot, E. & Bernstein, C. 1996. Time sharing between host searching and food searching in parasitoids: state-dependent optimal strategies. *Behavioral Ecology*, **7,** 189-194.

Sirot, E. & Bernstein, C. 1997. Food searching and superparasitism in solitary parasitoids. *Acta Oecologica*, **18,** 63-72.

Sirot, E., Ploye, H. & Bernstein, C. 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behavioral Ecology*, **8,** 226-232.

Smith, C. R., Toth, A. L., Suarez, A. V. & Robinson, G. E. 2008. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews Genetics*, **9,** 735-748.

Snedden, W. A. & Greenfield, M. D. 1998. Females prefer leading males: relative call timing and sexual selection in katydid choruses. *Animal Behaviour*, **56,** 1091-1098.

Steidle, J. L. M., Steppuhn, A. & Ruther, J. 2003. Specific foraging kairomones used by a generalist parasitoid. *Journal of Chemical Ecology*, **29,** 131-143.

Steiner, S., Steidle, J. L. M. & Ruther, J. 2007. Host-associated kairomones used for habitat orientation in the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research*, **43,** 587-593.

Stelinski, L. L., Oakleaf, R. & Rodriguez-Saona, C. 2007. Oviposition-deterring pheromone deposited on blueberry fruit by the parasitic wasp, *Diachasma alloeum*. *Behaviour*, **144,** 429-445.

Stephens, D. W. & Krebs, J. R. 1986. *Foraging theory*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Sundstrom, L., Chapuisat, M. & Keller, L. 1996. Conditional manipulation of sex ratios by ant workers: A test of kin selection theory. *Science*, **274,** 993-995.

Sutherland, W. J. 1996. *From individual behavior to population ecology*. Oxford: Oxford University Press.

Suzuki, Y. & Iwasa, Y. 1980. A sex ratio theory of gregarious parasitoids. *Researches in Population Biology*, **22,** 366-382.

Suzuki, Y., Tsuji, H. & Sasakawa, M. 1984. Sex allocation and effects of superparasitism on secondary sex ratios in the gregarious parasitoid, *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Animal Behaviour*, **32,** 478-484.

Takasu, K. & Hirose, Y. 1988. Host discrimination in the parasitoid *Ooencyrtus nezarae*: the role of the egg stalk as an external marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **47,** 45-48.

Takken, W. 1999. Chemical signals affecting mosquito behaviour. *Invertebrate Reproduction and Development*, **36,** 67-71.

Tena, A., Kapranas, A., Garcia-Marí, F. & Luck, R. F. 2008. Host discrimination, superparasitism and infanticide by a gregarious endoparasitoid. *Animal Behaviour*, **76,** 789-799.

Turlings, T. C. J., Alborn, H. T., Loughrin, J. H. & Tumlinson, J. H. 2000. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. *Journal of Chemical Ecology*, **26,** 189-202.

Turlings, T. C. J., Loughrin, J. H., McCall, P. J., Röse, U. S. R., Lewis, W. J. & Tumlinson, J. H. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92,** 4169-4174.

Turlings, T. C. J., McCall, P. J., Alborn, H. T. & Tumlinson, J. H. 1993. An elicitor in caterpillar oral secretions that induced corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, **19,** 411-425.

Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H. & Lewis, W. J. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, **250,** 1251-1253.

Ueno, T. 1994. Self-recognition by the parasitic wasp *Itoplectis naranyae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Oikos*, **70,** 333-339.

Ueno, T. 1997. Effects of superparasitism, larval competition and host feeding on offspring fitness in the parasitoid *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **90,** 682-688.

Ueno, T. 1999a. Host-feeding and acceptance by a parasitic wasp (Hymenoptera: Ichneumonidae) as influenced by egg load and experience in a patch. *Evolutionary Ecology*, **13,** 33-44.

Ueno, T. 1999b. Reproduction and host-feeding in the solitary parasitoid wasp *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, **35,** 231-237.

Uka, D., Hiraoka, T. & Iwabuchi, K. 2006. Physiological suppression of the larval parasitoid *Glyptapanteles pallipes* by the polyembryonic parasitoid *Copidosoma floridanum*. *Journal of Insect Physiology*, **52,** 1137-1142.

van Alebeek, F. A. N., Rojas-Rousse, D. & Leveque, L. 1993. Interspecific competition between *Eupelmus vuilleti* and *Dinarmus basalis*, two solitary ectoparasitoids of Bruchidae larvae and pupae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **69,** 21-31.

van Alphen, J. J. M. & Bernstein, C. 2008. Information acquisition, information processing, and patch time allocation in insect parasitoids. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field application* (Ed. by Wajnberg, E., Bernstein, C. & van Alphen, J. J. M.), pp. 172-192: Blackwell Publishing Ltd.

van Alphen, J. J. M. & Nell, H. W. 1982. Superparasitism and host discrimination by *Asobara tabida* Nees (Braconidae: Alysiinae), a larval parasitoid of drosophilidae. *Netherlands Journal of Zoology*, **32,** 232-260.

van Alphen, J. J. M. & Visser, M. E. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **35,** 59-79.

van Baaren, J., Boivin, G., Le Lannic, J. & Nénon, J. P. 1997. The male and female first instar larvae of *Anaphes victus* and *A. listronoti* (Hymenoptera: Mymaridae). *Zoomorphology*, **117,** 189-197.

van Baaren, J., Boivin, G. & Nénon, J. P. 1995. Intraspecific hyperparasitism in a primary hymenopteran parasitoid. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **36,** 237-242.

van Baaren, J., Landry, B. L. & Boivin, G. 1999. Sex allocation and larval competition in a superparasitizing solitary egg parasitoid: competing strategies for an optimal sex ratio. *Functional Ecology*, **13,** 66-71.

van Baaren, J. & Nénon, J. P. 1994. Factors involved in host discrimination by *Epidinocarsis lopezi* and *Leptomastix dactylopii* (Hym, Encyrtidae). *Journal of Applied Entomology*, **118,** 76-83.

van Baaren, J. & Nénon, J. P. 1996. Intraspecific larval competition in two solitary parasitoids, *Apoanagyrus (Epidinocarsis) lopezi* and *Leptomastix dactylopii*. *Entomologia experimentalis et applicata*, **81,** 325-333.

Van den Assem, J. & Kuenen, D. J. 1958. Host finding of *Choetospila elegans* Westw. (Hym. Chalcid.) a parasite of *Sitophilus granarius* L. (Coleopt. Curcul.). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **1,** 174-180.

van Dijken, M. J., van Stratum, P. & van Alphen, J. J. M. 1992. Recognition of individual-specific marked parasitized hosts by the solitary parasitoid *Epidinocarsis lopezi*. *Behavioral Ecology et Sociobiology*, **30,** 77-82.

Van Handel, E. 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **1,** 302-304.

van Lenteren, J. C. 1981. Host discrimination by parasitoids. In: *Semiochemicals: their role in pest control* (Ed. by Nordlund, D. A., Jones, R. L. & Lewis, W. J.), pp. 153-179. New York: Wiley-Intersciences.

van Lenteren, J. C., Ruschioni, S., Romani, R., van Loon, J. J. A., Qiu, Y. T., Smid, H. M., Isidoro, N. & Bin, F. 2007. Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Arthropod Structure & Development*, **36,** 271-276.

Vinson, S. B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **21,** 109-133.

Vinson, S. B. 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological control*, **11,** 79-96.

Vinson, S. B. & Hegazi, E. M. 1998. A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *Journal of Insect Physiology*, **44,** 703-712.

Visser, M. E. 1996. The influence of competition between foragers on clutch size decisions in an insect parasitoid with scramble larval competition. *Behavioral Ecology*, **7,** 109-114.

Visser, M. E., Luyckx, B., Nell, H. W. & Boskamp, G. J. F. 1992. Adaptive superparasitism in solitary parasitoids: marking of parasitized hosts in relation to the pay-off from superparasitism. *Ecological Entomology*, **17,** 76-82.

Völkl, W. & Mackauer, M. 1990. Age-specific pattern of host discrimination by the aphid parasitoid *Ephedrus californicus* Baker (Hymenoptera: Aphidiidae). *The Canadian Entomologist*, **122,** 349-361.

Waage, J. K. 1986. Family planning in parasitoids: adaptive patterns of progeny and sex allocation. In: *Insect Parasitoids* (Ed. by Greathead, J. W. D.), pp. 63-96. London: Academic Press.

Walker, T. J. 1993. Phonotaxis in female *Ormia ochracea* (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of field crickets. *Journal of Insect Behavior*, **6,** 389-410.

Wang, X. G. & Messing, R. H. 2004. Fitness consequences of body-size-dependent host species selection in a generalist ectoparasitoid. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **56,** 513-522.

Wang, X. G. & Messing, R. H. 2008. Role of egg-laying experience in avoidance of superparasitism by fruit fly parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Emtomological Society of America*, **101,** 656-663.

Weber, C. A., Smilanick, J. M., Ehler, L. E. & Zalom, F. G. 1996. Ovipositional behavior and host discrimination in three scelionid egg parasitoids of stink bugs. *Biological Control*, **6,** 245-252.

Werren, J. H. 1980. Sex ratio adaptations to local mate competition in a parasitic wasp. *Science*, **208,** 1157-1159.

Werren, J. H. 1983. Sex ratio evolution under local mate competition in a parasitic wasp. *Evolution*, **37,** 116-124.

Werren, J. H. 1984. Brood size and sex ratio regulation in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: pteromalidae). *Netherlands Journal of Zoology*, **34,** 123-143.

West, S. A., Griffin, A. S. & Gardner, A. 2007a. Evolutionary explanations for cooperation. *Current Biology*, **17,** R661-R672.

West, S. A., Griffin, A. S. & Gardner, A. 2007b. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *Journal of Evolutionary Biology*, **20,** 415-432.

West, S. A., Herre, E. A. & Sheldon, B. C. 2000. The benefits of allocating sex. *Science*, **290,** 288-290.

West, S. A., Reece, S. E. & Read, A. F. 2001. Evolution of gametocyte sex ratios in malaria and related apicomplexan (protozoan) parasites. *Trends in Parasitology*, **17,** 525-531.

West, S. A., Shuker, D. M. & Sheldon, B. C. 2005. Sex-ratio adjustment when relatives interact: a test of constraints on adaptation. *Evolution*, **59,** 1211-1228.

Wylie, H. G. 1966. Some mechanisms that affect the sex ratio of *Nasonia vitripennis* (Walk.) (Hymenoptera: Pteromalidae) reared from superparasitized housefly pupae. *The Canadian Entomologist*, **98,** 645-653.

Yamada, Y. & Ikawa, K. 2005. Superparasitism strategy in a semisolitary parasitoid with imperfect self/non-self recognition, *Echthrodelphax fairchildii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **114,** 143-152.

Yamada, Y. & Sugaura, K. 2003. Evidence for adaptive self-superparasitism in the dryinid parasitoid *Haplogonatopus atratus* when conspecifics are present. *Oikos*, **103,** 175-181.

Zappala, L. & Hoy, M. A. 2004. Reproductive strategies and parasitization behavior of *Ageniaspis citricola*, a parasitoid of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **113,** 135-143.

Sébastien LEBRETON

STRATEGIES DE PONTE EN SITUATIONS DE COMPETITION CHEZ UNE GUEPE PARASITOÏDE

Résumé

Les parasitoïdes se développent aux dépens d'un hôte. Chez les espèces solitaires, à cause de combats larvaires mortels, un seul adulte peut émerger d'un hôte donné, quel que soit le nombre d'œufs initialement pondus. L'objectif de cette thèse est d'étudier les stratégies de ponte des femelles d'un parasitoïde solitaire, *Anisopteromalus calandrae* en situation de compétition intraspécifique. Nos résultats montrent que les femelles sont capables de discriminer différents types d'hôtes (parasités / non parasités, parasités depuis plus ou moins longtemps et parasités par un œuf mâle ou femelle), en partie grâce à des signaux chimiques émanant de l'hôte. Elles ajustent ainsi leurs stratégies de ponte en conséquence, en fonction de la probabilité de survie de leurs descendants et de leur état physiologique.

Mots-clés : *Anisopteromalus calandrae*, Combats larvaires, Compromis évolutifs, Fitness, Kairomones, Parasitoïdes solitaires, Stratégies de ponte, Tubes alimentaires

Abstract

Parasitoids develop at the expense of a host. In solitary species, because of lethal larval fights, only one adult can emerge from a given host, whatever the number of eggs initially laid. The aim of this PhD is to study oviposition strategies of females of a solitary species, *Anisopteromalus calandrae*, under intraspecific competition conditions. Our results show that females of this species can discriminate different categories of hosts (unparasitized / parasitized, parasitized for different times and parasitized by a male or a female egg), partly due to chemical signals originally from the hosts. They consequently adjust their oviposition strategies, according to both the survival probability of their offspring and their own physiological state.

Key-words: *Anisopteromalus calandrae*, Discrimination capacities, Fitness, Host-feeding, Kairomones, Larval fights, Oviposition strategies, Solitary parasitoids, Trade-off