UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE S.S.B.C.V.

INSTITUT DE RECHERCHE SUR LA BIOLOGIE DE L'INSECTE

THÈSE présentée par :

Thanh Manh NGUYEN

soutenue le : **21 Juin 2013**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

EFFETS DES CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES (DENSITÉ EN HÔTES ET STRESS THERMIQUES) SUR QUELQUES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES MÂLES D'*ANISOPTEROMALUS CALANDRAE*

THÈSE dirigée par :

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

RAPPORTEURS :

Mme. JOLY Dominique	Directrice de recherche, HDR, CNRS-UPR 9034 Gif-sur-Yvette
Mme. KAISER-ARNAULD Laure	Chargée de recherche, HDR, INRA-Gif sur Yvette
Mme. MAGISTRINI Michèle	Ingénieure de recherche, HDR, INRA-Tours-Nouzilly

JURY :

M. CHEVRIER Claude	Professeur, Université François - Rabelais de Tours
M.DUGRAVOT Sébastien	Maître de conférences, Université de Rennes 1
M. JALOUX Bruno	Maître de conférences, Agrocampus Ouest Centre d'Angers
Mme. JOLY Dominique	Directrice de recherche, HDR, CNRS-UPR 9034 Gif-sur-Yvette
Mme. KAISER-ARNAULD Laure	Chargée de recherche, HDR, INRA-Gif sur Yvette
M. LAZZARI Claudio	Professeur, Université François - Rabelais de Tours
Mme. MAGISTRINI Michèle	Ingénieure de recherche, HDR, INRA-Tours-Nouzilly
M. MONGE Jean Paul	Professeur, Université François - Rabelais de Tours

A mes parents

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une thèse de doctorat de l'Université de Tours, financé par le Gouvernement Vietnamien.

Mon directeur de thèse, le professeur Claude Chevrier m'a accueilli au sein de son équipe et m'a immédiatement accordé une autonomie à laquelle ma qualité même de « très bon élève » au Vietnam ne m'avait peut être pas, de prime abord, préparé. Je le remercie d'avoir encadré ce long travail, de m'avoir soutenu malgré un emploi du temps chargé, enfin, d'avoir assuré une relecture finale, exigeante, en passant outre les critères de temps.

Mes remerciements iront aussi à Monsieur le Directeur de l'IRBI, Jean Paul Monge. Il m'a accueilli à l'Institut avec confiance et a facilité amplement les démarches administratives. Démarches qui furent aussi facilitées grâce au concours de Mesdames Sarazin et Chetout du CLOUS de Tours. Je leur en suis sincèrement reconnaissant.

Je tiens également à remercier Joli Dominique, Laure Kaiser-Arnauld et Michèle Magistrini qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse et Jean Paul Monge, Claudio Lazzari, Bruno Jaloux et Sébastien Dugravot qui ont accepté de faire partie du jury.

L'aide précieuse de Christophe Bressac a été pour moi d'un réel réconfort tant ce travail a été prenant. Il m'a encadré avec un grand sens de l'amitié. Je lui adresse un merci tout aussi amical et obligé. Je remercie Charlotte Lécureuil et Nathalie Rougière d'avoir valorisé mes résultats dans un article associé à l'équipe.

Claudio Lazzari m'a fourni des conseils précieux que David Giron m'a encouragé à appliquer. Merci à eux!

Et que seraient mes élevages, sans la compétence d'Eric Imbert et Cindy Menoret ? Non contents de les avoir surveillés avec rigueur, je les remercie des « petits coups de pouce » donnés dans certaines expérimentations. Bruno Brizard m'a fabriqué une « superbe machine » respiratoire et Jean-Philippe Christidès m'a fourni les masques. Tous soucieux de me laisser en bonne santé tout au long de cette thèse. Merci de leur gentillesse et de leur prévenance, ils m'ont aidé « à tenir ».

Ce fut très important pour moi de trouver quelques sourires, encouragements, surtout à mon arrivée. Fabienne Bouchaud, Olivier Roussel m'ont facilité cette intégration. Je leur redonne un merci tout aussi souriant.

Je remercie spécialement tous les thésards et les « ex-thésards » à l'IRBI que j'ai pu côtoyer au cours de ces années. Ils m'ont admis dans cette grande famille de chercheurs et cela est un grand facteur d'encouragement et d'émulation. Merci de cette fidélité amicale, enrichissante, tonique d'échanges et d'aide, que m'ont offert Chloé et Clément. Merci aussi pour tous les bons moments que l'on a partagés. J'ai aussi ce souvenir ému et reconnaissant envers Sébastien qui m'a assisté lors de ma première manipulation. Odette m'offrait son amitié à l'internationale, Miguel et Antoine me sortaient « la tête de l'eau » quand les tests statistiques, mille fois enregistrés, classés, me tournaient la tête comme « un abruti ». Je les associe dans mes remerciements à Alicia, Denis, Gaëlle, Julien, Marlène, Mélanie, Sylvain, Virginie auxquels se mêlèrent allégrement Amélie, Marjorie, Jeremy, Sylvain, Wilfried pour cette fois, de belles détentes collectives.

Je n'oublie pas Mauricette, mon unique stagiaire qui m'a fait vivre de bons moments de fraternité vietnamo - africaine dans le travail.

L'IRBI est aussi une grande famille où chacun contribue à soutenir les étudiants, c'est ce que font avec gentillesse et professionnalisme Nadine, Teresita, Vonnick, Carole, Aurore et Karine.

J'avais besoin de cet environnement chaleureux pour réussir et c'est ce que « l'Association Touraine - Vietnam » m'offrait quand je quittais mon labo. Jean Jacques Rousselle, son président, se doutait-il quand il a crée l'Association que beaucoup d'étudiants Vietnamiens dont moi allaient désormais l'associer à leur réussite. Catherine, Dominique, Jacques, Régine et leur Damien, Herve et Morgane et leur Valentine en attente de son sourire , Denise et Pierre, Dannie et Jacques, Claire et Arnaud, Yvette et Jean, Thuy et Jeremie Nadège, Véronique, Jennifer et Christopher, Nga et Phuong, Nhan, Thy… Tous m'ont associé à leurs activités, leur voyage, leur vie... Ils m'ont fait aimer la France. Françoise, notre secrétaire « bien aimée », Monique et Gérard qui ont travaillé avec moi le français, corrigé et corrigé encore. Merci à vous de votre attention, votre exigence et sollicitude.

Et puis, Monsieur et Madame Grégoire qui m'ont aidé dans tous les sens du terme. Et les amis d'amis, les Lalle, les Raimbaut, les Pinon, et tant d'autres qui m'ont accueilli si spontanément.

J'adresse un grand merci à mes chers amis Dung, Doan et leur petit Kien, Trinh, Tri et leur petite Amandine, Viet Anh, Trinh, Huong et Duc, Giang, tous les membres de MEF1… ils étaient loin, trop loin mais si près de mon cœur.

Merci aussi à Guillaume, Manu, Nico, Aurélie, Céline, Fred, Céline, Maya, Slimane, Justine pour les randonnées que l'on a faites, pour les soirées « jeux sociaux », « déguisement », merci pour votre soutien, votre attention et votre amitié.

Je voudrais remercier le SUAPS de l'Université de Tours, des randonneurs, des joueurs, des danseurs merci de tous ces bons moments si chaleureux.

Ma famille me manquait beaucoup, Monique et Gérard m'ont ouvert les portes de leur grande famille de Chambray, de Chartres, du Nord. Mon émotion est grande d'avoir vu leurs petits fils Alphara et Ambroise grandir. Ils m'ont donné ce bien inestimable de me sentir aimé. Vous ne voulez pas de merci, je vous le dirai bientôt à Hanoï.

Enfin, tout mon travail, je l'offre à mes parents, mon frère, ma sœur malgré les 10 000 kms qui me séparaient d'eux, c'est leur confiance et leur force qui m'amènent à être devant vous aujourd'hui. C'est un profond merci et respect que je leur témoigne.

Je repars maintenant vers eux, vers mon pays, certes enrichi de connaissances de thésard et j'en remercie l'Université, mais doublement enrichi de votre magnifique et inoubliable solidarité à mon égard.

A tous ceux que j'ai oubliés, qu'ils m'en excusent.

Résumé

Chez les parasitoïdes, le succès reproducteur n'est pas seulement de permettre une perpétuation de l'espèce il est aussi très important pour la lutte biologique contre les insectes nuisibles. Donc, il est essentiel que la population se développe durablement et produise des descendants fertiles. Au cours de leur vie, à cause de leur petite taille, les parasitoides doivent faire face aux contraintes écologiques (biotiques et abiotiques) qui peuvent agir directement ou indirectement sur l'individu, impliquant des changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux qui, à leur tour, affectent la survie et notamment le succès reproducteur d'individus. L'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre les conséquences des contraintes écologiques sur la reproduction à partir d'un ectoparasitoide *Anisopteromalus calandrae*. Nos résultats montrent que la décision de ponte des femelles parasitoïdes est liée à la densité en hôtes qui affecte à la fois la taille des individus et leur fitness avec comme conséquence une augmentation du nombre de mâles dans la descendance. D'autre part, le stress thermique appliqué soit au stade nymphal ou adulte cause des effets négatifs sur la survie et une diminution de spermatozoïdes est également observée. Les mâles stressés sont également de moins bons compétiteurs. Les causes de la diminution de la production de spermatozoïdes suite à un stress thermique chaud appliqué au stade larvaire ou adulte sont discutées. L'ensemble de nos résultats non seulement confirment que l'effet des contraintes écologiques sur la reproduction des mâles de parasitoïdes est très important (mâles hypofertiles, moins bons compétiteurs…), mais également nous permettent d'émettre des hypothèses sur les modifications de la biodiversité qui pourraient survenir suite à un réchauffement climatique global.

Mots-clés: *Anisopteromalus calandrae*, Male fitness, Parasitoïdes solitaires, Stratégies de ponte, Stress thermique, Choc thermique, Spermatozoïde, Hypofertilité, Sex-ratio, Survie

Abstract

In parasitoids wasps, reproductive success not only perpetuation of the species, it is also a very important factor for biological control against pests, since it is essential that the population grows and sustainably produce fertile offsprings. During their lives, because of their small size, parasitoids face ecological constraints (both biotic and abiotic) that may affect directly or indirectly the individuals, involving changes in their morphology, physiology or behavior, which in turn, affect the survival and reproductive success. The overall objective of this thesis was to better understand the consequences of the ecological constraints on reproduction in the ectoparasitoid wasp *Anisopteromalus calandrae*. Our results show that the parasitoid females' decision to lay eggs is related to the host density that affects both the offspring's size and fitness, consequently increasing the number of males in the offspring. On the other hand, the thermal stress applied to the pupae or adults had negative effects on survival and decreased the quantity of sperm. Moreover, stressed males are less successful competitors. The causes of the decrease in sperm production after a heat treatment applied to larval or adult are discussed. Our results not only confirm that the effect of environmental constraints on male parasitoids' reproduction is very important (subfertile males, less successful competitors...) but also allow us to speculate on changes in biodiversity that may arise as a result of global climate warming.

Keywords: *Anisopteromalus calandrae*, Male fitness, Solitary parasitoids, Egg laying strategy, Heat treatment, Sperm, Hypofertility, Sex-ratio, Survival rates.

Table des matières

Introduction Générale **16**
Insectes et température : plus qu'une relation 21
Réponse des insectes soumis aux basses températures 26
Réponse des insectes soumis aux hautes températures 30
Mode de vie des parasitoïdes 34
Modèles Biologiques **36**
La plante hôte *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 37
Le bruche cosmopolite du niébé *Callosobruchus maculatus* (Fab.) 39
Anisopteromalus calandrae (Howard) - un insecte auxiliaire pour la protection des stocks 41
Partie 1 Effets de la densité en hôtes **46**
Avant-propos **47**
Introduction **49**
Matériel et méthode **52**
Obtention de graines parasitées 52
Obtention de mâles et de femelles vierges 53
Accouplements 53
Mise en ponte des femelles accouplées 54
La durée de vie des femelles accouplées 55
Le nombre de descendants 56
La sex-ratio 56
Taille de la descendance 56
Analyses statistiques des données 57
Résultats **58**
La durée de vie des femelles accouplées 58
Nombre de descendants 58
Taille de la descendance 62
Discussion **62**
Effet de la densité en hôtes sur la décision de ponte des femelles 63
Effet de la densité en hôtes sur la sex-ratio des descendants 64
Effet de la densité en hôtes sur la taille des descendances 65

Partie 2 Effets du stress thermique **67**
Avant - propos **68**
Chapitre 1 Effets des basses températures appliquées au stade larvaire sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae* **70**
Introduction **71**
Matériel et méthodes **73**
Le système de graines artificielles 73
Obtention des femelles vierges 73
Mise en ponte 74
Développement des mâles après un stress thermique de longue durée 74
Paramètres mesurés 76
Durée de développement des mâles 76
Taille des mâles 76
Nombre de spermatozoïdes 76
Analyses statistiques des données 76
Résultats **77**
Durée de développement et pourcentage de mâles qui émergent 77
La morphologie 78
Nombre de spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales des mâles 1 jour après émergence 79
Discussion **79**
Chapitre 2 Effets des hautes températures appliquées au stade larvaire sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae* **82**
Article 1 Heat stress affects male reproduction in a parasitoid wasp **83**
Abstract **84**
Introduction **85**
Materials and Methods **88**
High temperature treatments 88
Male fertility after heat treatment 90
Statistical analyses 91
Results **92**
Discussion **97**
Acknowledgements **100**

Chapitre 3 Effets des hautes températures appliquées au stade adulte sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae* 101
Article 2 Heat shock affects male reproduction in a parasitoid wasp 102
Abstract 103
Introduction 104
Materials and Methods 106
Insect breeding 106
Preliminary study to choice the temperature and duration of heat treatment for subsequently experiments 107
The 48°C treatment was applied during 10 min to 2 male statuses: 1-day-old virgin male (vM) and 1-day-old previously mated male (PmM) 108
Male survival after high temperature treatment 109
Male fertility after heat treatment 109
Statistical analysis 110
Results 110
Preliminary experiment 110
Effect of high temperature treatment on the survival 111
Sperm production according to age of males after 48°C heat treatment during 10 min 112
The capacity of mating and the offspring's sex-ratio 113
Discussion 114
Acknowledgements 116
Discussion générale sur les effets des stress thermiques (froid ou chaud) appliquées au stade larvaire ou adulte sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae* 117
Perspectives 124
Bibliographie 131
Annexes 157
Résumé 159
Abstract 159

Liste des tableaux

Tableau 1 - Quelques arthropodes utilisables en lutte biologique (d'après Suasa-ard, 2010) . 18
Tableau 2 - Réponse physiologique des insectes à la température (Fields, 1992) 25
Tableau 3 - Stade de devéloppement de l'hôte attaqué 35
Table 1 - Measure of acute thermal tolerance of *A. calandrae* males exposed at five different temperatures for varying lengths of times after treatment 111
Table 2 - Males' Representativeness Index (MRI*) in F_1 generation of male winners aged 10 days after male-male competition 114
Tableau 3 - Résumé des principaux résultats sur l'influance des stress thermiques (froid ou chaud) appliqués chez *A. calandrae* au stade larvaire et/ou adulte sur quelques traits d'histoires de vie 118

Liste des figures

Figure 1- Courbe théorique de performance en fonction de la température corporelle chez les ectothermes. La température critique minimum (CTmin) et la température critique maximum (CTmax), sont respectivement les températures corporelles minimales et maximales pour lesquelles la performance est possible. Adapté de Huey and Stevenson (1979). 22

Figure 2 - Echelle thermobiologique d'un insecte intolérant à la congélation. Adapté d'après Vannier (1994) et Uvarov (1931) 24

Figure 3 - La plante hôte *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 37

Figure 4 - Le bruche cosmopolite du niébé *Callosobruchus maculatus* (Fab.) 39

Figure 5 - Le cycle du développement de *Callosobruchus maculatus* 40

Figure 6 - *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Lebreton, S.) 41

Figure 7 - La famille de Pteromalidae d'après Burks (1979) 42

Figure 8 - Cycle du développement d'*Anisopteromalus calandrae* 44

Figure 9- Les décisions d'une femelle avant de pondre ses œufs (d'après Charnov et Skinner, 1988) 48

Figure 10 - Les conséquences de la décision de ponte d'une femelle sur les descendants 50

Figure 11 - Comportement d'accouplement chez *Anisopteromalus calandrae* entre un mâle aux yeux noirs et une femelle aux yeux rouges. Le morphe noir correspond à la souche sauvage ; le morphe rouge à la souche mutante (Do Thi Khanh *et al.*, 2005) 54

Figure 12 - Le système de patch de ponte 55

Figure 13 - Evolution de la largeur de la tête du mâle en fonction de son poids frais (d'après Lacoume *et al.*, 2006) 57

Figure 14 - La survie des femelles d'*A. calandrae* accouplées en fonction de la densité en hôtes 58

Figure 15 - Le nombre moyen quotidien de descendants en fonction de la densité en hôtes sur la durée de ponte des femelles 59

Figure 16 - Proportion de mâles produits chaque jour en réponse à la densité en hôtes dans les patchs de ponte ($y = -0.0153x + 0.0658$, $r^2 = 0.3384$ pour les patchs A (2-4 hôtes) ; $y = -0.0265x + 0.0683$, $r^2 = 0{,}805$ pour les patchs B (7-14 hôtes) ; *t.test*, $p < 0.05$) 60

Figure 17 - Proportion de mâles produits dans la descendance globale ($y = -0.0039x + 0.3937$, $r^2 = 0.3502$ pour les patchs A (2-4 hôtes) ; $y = -0.0019x + 0.6336$, $r^2 = 0{,}7661$ pour les patchs B (7-14 hôtes) ; *t.test*, $p < 0.05$) 61

Figure 18 - Comparaison de la taille de descendants en fonction de la densité en hôtes..... 62
Figure 19 - (a) Patch de ponte contenant des gélules renfermant chacune une larve hôte et (b) système artificiel de développement 74
Figure 20 - Développement des mâles sans et après un stress thermique de longue durée 75
Figure 21 - Durée de développement des mâles en fonction de la température appliquée sur la nymphe blanche durant 3 jours..... 77
Figure 22 - Pourcentage d'émergence des mâles après un stress thermique appliqué sur la nymphe blanche durant 3 jours..... 78
Figure 23 - Effet de la température sur la taille des mâles à l'émergence 78
Figure 24 - Nombre de spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales des mâles traités et témoins 1 jour après l'émergence..... 79
Figure 1 - Emergence rate of males after 3 days of heat treatment at the early nymphal stage. 30°C is the control temperature. Lines indicate 25% and 50% of non-emerging males. Numbers and statistics in text..... 92
Figure 2 - Sperm in seminal vesicles of heat-stressed A. calandrae males (3 days at early nymphal stage). Virgin males were dissected on the day of emergence. Numbers and detailed statistics in text. Letters indicate differences between series (Student t-tests, $p < 0.001$) 93
Figure 3 -Mean number of sperm in seminal vesicles of control (30°C - open circles) and heat-stressed virgin *A. calandrae* males (38°C - filled circles) in the course of ageing. Day O corresponds to the emergence day. Bars are mean standard errors. Numbers and de tailed statistics in text. Letters indicate differences between series (student t-test, $p<0.001$) 94
Figure 4 - Survival after temperature treatment at early nymphal stage in *A. calandrae* virgin males with a sucrose source. Horizontal line indicates 50% survival. Numbers and statistics are in the text 95
Figure 5 - Sperm counted in spermathecae of *A. calandrae* females mated with either a male stressed for 3 days at 38°C during the nymphal stage (38°C) or one maintained at 30°C (control). Series are highly different, Welch t-test, df=46, t=12.0, $p<0.001$..... 96
Figure 6 - Offspring sex ratio (females/total) of *A. calandrae* females mated with either a male stressed for 3 days at 38°C during the nymphal stage (38°C) or one maintained at 30°C (control). Sex ratios were treated as quantitative values, series are highly different, Welch t-test, df=41, t=14.3, $p<0.001$ 97

Figure 1 - Survival one day and nine days after high temperature treatment (48°C, 10 min) at adult stage in *A. calandrae* males in 2 statuses: virgin males (vM) and preliminary mated males (PmM). Number and statistics are in the text..... 112
Figure 2 - Sperm counted in seminal vesicles of 2 days old and 10 days old *A. calandrae* males with either a male heat shocked for 10 min at 48°C during the adult stage (one day after emergence) or one maintained at 30°C (control). * Sperm counted in seminal vesicles at emergence (Previously counted in Nguyen *et al.*, 2013). Box plot show median (solid line), quartiles as 75% upper and 25% lower (box). Standard deviation (upper and lower bars) and outliers' data (open circles). Number and detailed statistics in the text, Fig. 2a: virgin status (vM), Fig. 2b: preliminary mated males (PmM). 113
Figure 25 - Coupe longitudinale dans le testicule d'*A. calandrae* non stressé (Mauricette OUALI N'GORAN S-W) 127
Figure 26 - Coupe longitudinale dans le testicule d'*A. calandrae* ayant subi un stress thermique (Mauricette OUALI N'GORAN S-W) 127

Liste des annexes

Annexe 1 - Organisation de l'appareil reproducteur mâle d'*A. calandrae* (Bressac, C.)

Annexe 2 - Article en premier auteur

Annexe 3 - Article en co-auteur

Introduction Générale

Introduction générale

En milieu agricole et forestier, depuis plusieurs décennies la protection des cultures contre les insectes nuisibles s'effectue sous différentes formes souvent en opposition d'un point de vue déontologique et de la protection de l'environnement, comme la lutte chimique et la lutte biologique. La protection chimique des cultures met en œuvre encore aujourd'hui principalement les insecticides qui restent encore les plus efficaces (Lhoste et Normand, 1987). Mais malgré son efficacité, la lutte chimique pose beaucoup de problèmes sur l'environnement et la santé du public. Selon Schiffers et Wainwright (2011), les risques engendrés par la lutte chimique sont réels et ont fait l'objet de nombreux constats d'experts:

- présence de résidus à des concentrations préjudiciables à la santé du consommateur dans les produits récoltés ;
- pollution des eaux de surface et des eaux souterraines ;
- destruction des auxiliaires et, de manière générale, perte de biodiversité ;
- atteinte à la santé des opérateurs, et à celle de leurs familles, par une exposition répétée ;
- accidents fréquents (empoisonnements involontaires) ;
- développement de résistances chez les parasites à combattre ;
- apparition de nouveaux agresseurs jusqu'alors passés inaperçus ;
- réduction de la fertilité des sols.

De manière générale, la protection chimique des cultures, même si elle est le plus souvent efficace, ne donne plus satisfaction, non seulement par rapport à la durabilité des agro-écosystèmes (perte de diversité biologique, dégradation de la qualité physico-chimique du milieu), mais aussi à cause de son efficacité toujours plus limitée par la manifestation de résistances des ravageurs, des modifications des spectres parasitaires et par l'apparition de graves déséquilibres dans le milieu (pollution des eaux, contamination du sol et de l'air).

Il est préférable de remettre en question l'efficacité de la lutte chimique et de la remplacer par une autre méthode de protection dans le cadre d'une agriculture durable. Il y a une alternative à la lutte chimique pour la protection des cultures contre les organismes nuisibles : c'est la lutte biologique. La lutte biologique est une méthode qui consiste à combattre un ravageur, par l'utilisation de ses ennemis naturels, ou une maladie, en favorisant ses antagonistes (Schiffers et Wainwright, 2011). L'objectif de la lutte biologique est donc à

terme de remplacer, en totalité ou en partie, les pesticides chimiques utilisés en agriculture et en foresterie (Bovin, 2001). Elle présente plusieurs avantages:

- efficace ;
- utilisable en serre ;
- avoir un produit moins polluant (pas de résidus chimiques) ;
- permet de réduire ou de remplacer l'utilisation de pesticides chimiques ;
- permet de diminuer le risque d'apparition de résistance aux produits chimiques ;
- une réduction des risques pour la santé des travailleurs agricoles ;
- faible coût de développement ;
- le respect de l'environnement, maintien de la biodiversité.

Les agents majeurs de la lutte biologique sont des prédateurs, des parasitoïdes, des nématodes, ou des pathogènes contre les insectes nuisibles des plantes. Par exemple, les coccinelles sont des prédateurs bien connus des pucerons, les Trichogrammes sont des parasitoïdes recommandés pour les ravageurs du maïs ou canne à sucre et bien les bactéries ou les virus peuvent provoquer certaines maladies chez les insectes nuisibles (Tableau 1).

Tableau 1 - Quelques arthropodes utilisables en lutte biologique (d'après Suasa-ard, 2010)

Insectes parasitoïdes		**Insectes nuisibles**
Hymenoptera		
Aphelinidae	*Aphelinus gossypii*	*Aphis gossypii* (Homoptera: Aphidae)
Braconidae	*Chalonus* sp.	*Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)
Encyrtidae	*Tassonia magniclava*	*Myzus persicae* (Homoptera: Aphidae)
Eulophidae	*Ceranisus brui*	*Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae)
Ichneumonidae	*Temelucha philippinensis*	*Chilo infuscatellus* (Lepidoptera: Pyralidae)
Pteromalidae	*Anisopteromalus calandrae*	*Bruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae)

Scelionidae	*Telenomus rowani*	*Scirpophaga excerptalis* (Lepidoptera: Pyralidae)
Trichogrammatidae	*Trichogramma chilonis*	*Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae)
Diptera		
Tachinidae	*Exorista sorbilans*	*Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)
Insectes prédateurs		**Insectes nuisibles**
Acarica		
Phytoseiidae	*Amblyseius* sp.	*Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae)
Coleoptera		
Anthicidae	*Anthicus ruficollis*	*Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae)
Coccinellidae	*Coccinella transversalis*	*Aleurolobus barodensis* (Homoptera: Aleyrodidae)
Meloidae	*Epicauta maclini*	*Patanga succincta* (Orthoptera: Acrididae)
Diptera		
Drosophilidae	*Gitona perspicax*	*Saccharicoccus sacchari* (Homoptera: Pseudococcidae)
Hemiptera		
Anthocoridae	*Wollastoniella parvicuneis*	*Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae)
Geocoridae	*Geocoris* sp.	*Aphis gossypii* (Homoptera: Aphidae)
Nabidae	*Nabis* spp.	*Aphis gossypii* (Homoptera: Aphidae)

Parmi les insectes auxiliaires, les parasitoïdes jouent un rôle important dans la lutte biologique grace à leur mode de vie - un stade de leur vie (souvent le stade larvaire) ils se développent en se nourrissant d'autres arthropodes. Ils se développent sur ou à l'intérieur d'un autre organisme qui s'appelle « hôte » et tuent inévitablement ce dernier au cours de ce développement ou à la fin de ce développement. Les parasitoïdes peuvent être des insectes, des nématodes, des champignons, des protistes, des bactéries ou des virus (Eggleton et Gaston, 1990). Cependant, la majorité des parasitoïdes étudiés et répertoriés sont des insectes (Boivin, 1999) : Coléoptères, Lépidoptères, Diptères… et les plus connus sont les Hyménoptères comme les Eulophidae, les Pteromalidae, les Ichneumonidae, les Braconidae… Ils sont utilisés en agriculture bio car ils sont très efficaces pour limiter les populations d'insectes ravageurs et avec un certain nombre, ils sont plus efficaces que le pesticide. Par exemple, pour lutter contre la noctuelle *Helicoverpa armigera* - un des principaux insectes nuisibles du tournesol en Asie du sud, on utilise *Trichogramma chilones* - un parasitoïde oophage comme agent de lutte biologique. En relâchant 70 000 parasitoïdes par hectare, la récolte de graines de tournesol était de 1,52 tonne par hectare par rapport à 1,20 tonne par hectare en application de l'insecticide (Aganon et Raj Adhikari, 2004).

Ces insectes, faciles à élever en laboratoire et utilisés en agronomie dans le contrôle des populations d'insectes ravageurs de culture ou de récoltes, présentent également d'autres avantages, décrits dans la revue qui suit (Lécureuil *et al.*, 2012). Ce sont de bons modèles pour comprendre les mécanismes induisant l'hypofertilité et ouvrir peut-être de nouvelles pistes de recherche chez les vertébrés.

Comme tous les insectes, la vie des parasitoïdes est influencée par des facteurs écologiques : les facteurs biotiques (interactions des insectes entre eux), le plus souvent dépendant de la densité de la population (nourriture disponible, pression de prédation, la compétition d'une même espèce…) et les facteurs abiotiques (la lumière, le vent, l'humidité, la température…), généralement indépendants de la densité de la population sur laquelle ils exercent leurs effets. La température joue un rôle de facteur limitant pour de très nombreuses espèces (Hallman and Denlinger, 1998). Elle agit sur leur métabolisme général (enzymes, respiration, le système nerveux, les déplacements…) (Neven, 2000), leur developpement, la survie et la reproduction (Denlinger et Yocum, 1998 ; Mironidis et Savopoulou-Soultani, 2010 ; Medeiros *et al.*, 2003). Les parasitoïdes sont particulièrement sensibles aux variations de température à cause de leur petite taille et de leur physiologie d'ectotherme. La

régulation de leur température corporelle dépend donc de la température extérieure (Lee et Denlinger, 1991 ; Thomas et Blanford, 2003) qui est un facteur déterminant les traits d'histoire de vie d'un parasitoïde.

Insectes et température : plus qu'une relation

Les insectes sont des poïkilothermes : leur température corporelle varie avec celle du milieu. Autrement dit qu'ils ne produisent pas du tout ou pas suffisamment de chaleur pour maintenir une température corporelle constante. Ainsi ils sont totalement dépendants de la température environnementale. Celle-ci est considérée comme la plus désavantageuse chez les insectes. Puisque la température joue un rôle primordial dans plusieurs phases du cycle biologique (seuil de froid pour la mortalité hivernale, seuil de température minimale pour l'essaimage, la durée de développement et le nombre de générations par an ...), elle est un des facteurs abiotiques déterminant de la dynamique de la population, influençant le plus la vie des insectes.

La raison fondamentale de cette dépendance provient du fait que la vitesse des réactions biochimiques dépend en grande partie de la température. L'augmentation de la température a pour effet d'augmenter la vitesse d'agitation des molécules, et par conséquent leur énergie cinétique favorisant ainsi les interactions, et donc les réactions entre plusieurs molécules (Issartel, 2002). En général, les activités cellulaires s'effectuent avec plus ou moins d'efficacité entre 0 et 45°C. Les optimums de fonctionnement variables avec les espèces se situent entre 2 et 40 °C (Gilles, 2006). Un changement de la température a de nombreuses répercussions sur les mécanismes physiologiques. Plus la sensibilité thermique est élevée, plus la réponse de l'organisme à la moindre variation thermique sera forte, ce qui peut engendrer de graves perturbations physiologiques et biochimiques, donc altérer la survie de l'individu (Lacoume, 2007). Par conséquence, les organismes survivent, exécutent et se reproduisent à travers une gamme de températures qui correspond à la zone de tolérance (Levins, 1968 ; Huey et Stevenson 1979 ; Denlinger et Yocum, 1998) (Figure 1).

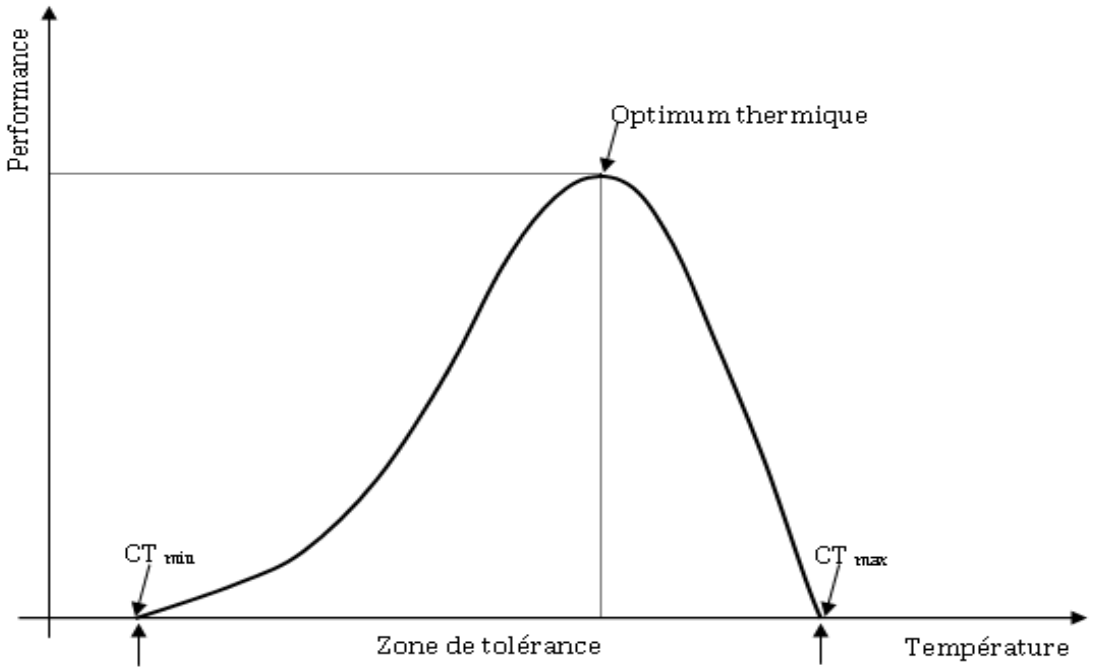


Figure 1- Courbe théorique de performance en fonction de la température corporelle chez les ectothermes. La température critique minimum (CTmin) et la température critique maximum (CTmax), sont respectivement les températures corporelles minimales et maximales pour lesquelles la performance est possible. Adapté de Huey and Stevenson (1979).

La zone de tolérance est comprise entre les températures corporelles minimales et maximales pour lesquelles les fonctions physiologiques sont possibles ; en dehors de ces limites, les insectes meurent. La plus basse température est la température critique minimum (CT_{min}) et la plus haute température est la température critique maximum (CT_{max}) (Rust et Reierson, 1998). Dans cette zone de tolérance, il y a une température où les performances des insectes sont optimales (optimum thermique) (Denlinger et Yocum, 1998). Chaque espèce a une zone de tolérance différente mais en général, la plupart des insectes ont la température optimale entre 25 - 33 °C, la température inférieure entre 13 - 25 °C et la température supérieure entre 33 - 35 °C (Fields, 1992). Par exemple, chez les cochenilles farineuses *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, l'optimal thermique est de 27 °C. Cette espèce peut donc se développer dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 35 °C (Minko, 2009). Alors que chez *Calleida decora* - un prédateur des Lepidoptère, la température optimale pour le dévéloppement est de 26,7 °C et la température inférieure et supérieure de dévéloppement sont respectivement de 12,8 °C et 35 °C (McWhorter *et al.*, 1984).

Pour expliquer l'évolution de la sensibilité thermique chez les ectothermes, deux hypothèses ont été proposées par Huey et Hertz (1984). La première, « hotter is better », prédit que la sélection de températures plus élevées est associée à de meilleures performances. La deuxième, « a jack-of-all-temperatures is a master of none », prédit que plus la gamme de températures sélectionnée est large, moins la performance maximale est élevée (Figure 1). En d'autres termes, une espèce specifique va montrer de meilleures performances dans une gamme réduite de températures par rapport à une espèce généraliste qui va montrer des performances moyennes dans une gamme plus large. Ces deux hypothèses ont permis d'établir un cadre théorique permettant de formuler des prédictions sur les stratégies de thermorégulation des ectothermes (Lelièvre, 2006).

Lorsque les insectes sont soumis à des températures extrèmes, soit létale ou sublétale, ils sont completement affectés. Des effets délétères peuvent apparaître tant au niveau morphologique, physiologique que comportemental. Par exemple, chez *Anaphes victus* - un oophage parasitoide, les œufs parasités sont soumis à 4 °C pendant 3, 6 et 12 semaines. A l'émergence, les parasitoides ne peuvent pas utiliser leurs antennes pour localiser l'hôte et ils ont perdu leur capacité de parasitisme (Baaren *et al.*, 2006). L'influence de la température sur la vie d'un insecte peut être représentée par un diagramme appelé échelle thermo biologique qui est spécifique à chaque espèce étudiée (Uvarov, 1931) (Figure 2). Cette échelle représente la succession des états physiologiques pour lesquels un insecte peut résister lorsque la température extérieure est modifiée. Elle comporte différentes zones thermiques.

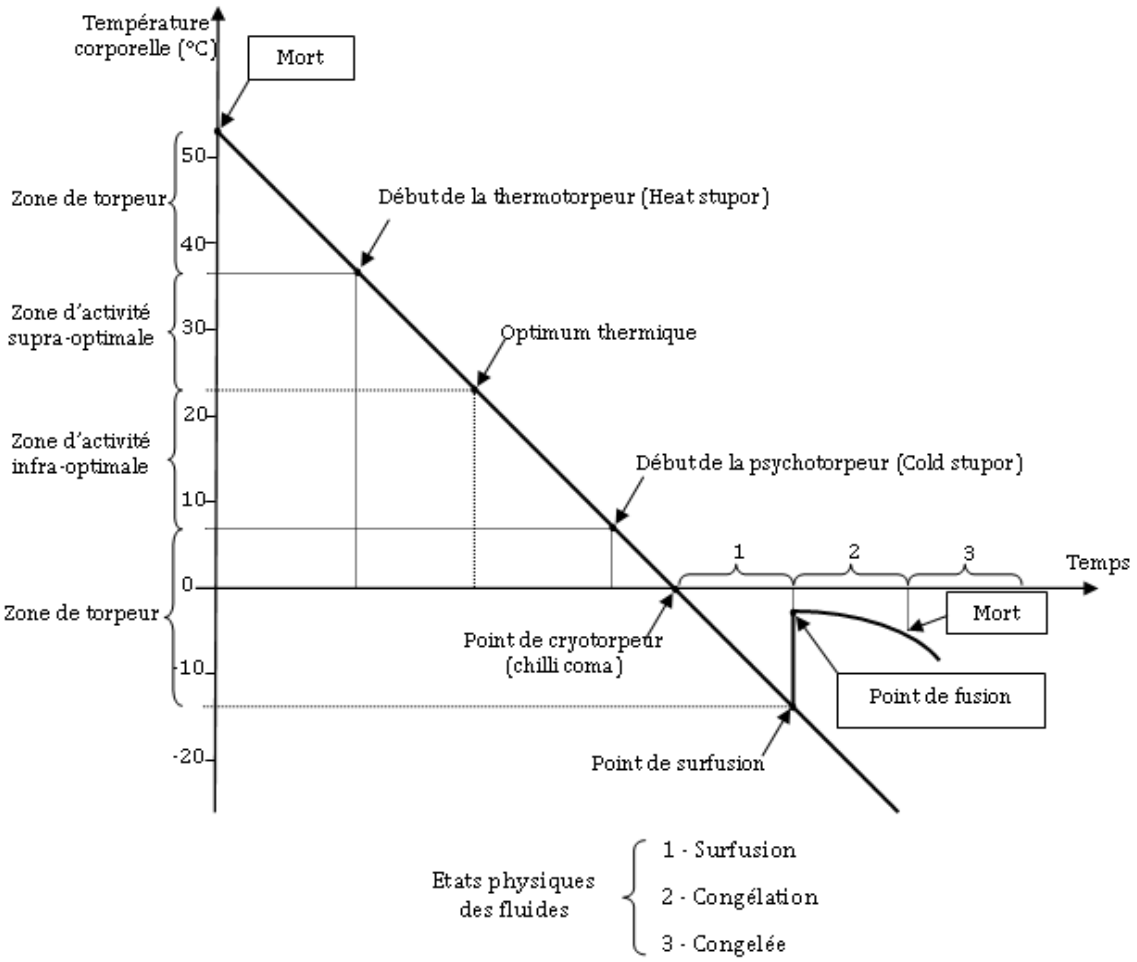


Figure 2 - Echelle thermobiologique d'un insecte intolérant à la congélation. Adapté d'après Vannier (1994) et Uvarov (1931)

Dans la zone de tolérance, si on prend la température optimale comme un point de départ, le diagramme montre deux zones de températures intermédiaires séparées par la température optimale: la zone de température supra-optimale pour laquelle les fonctions vitales de l'insecte sont dynamisées, la zone infra-optimale pour laquelle un ralentissement des fonctions vitales de l'insecte apparaît (Vannier, 1994). Dans les zones létales, l'échelle de temps n'est pas définie. Selon l'espèce plus ou moins acclimatée et tolérante au gel ou à la chaleur, la durée d'exposition aux températures conduisant finalement à la mort de l'insecte dans ces deux situations extrêmes, est très variable. Lorsque la température augmente au dessus de la zone supra-optimale, l'activité motrice s'arrête au point de thermotorpeur et après l'insecte atteint sa température limite supérieure et meurt en quelques minutes. A l'opposé, quand la température descend en dessous de la zone infra-optimale, l'organisme atteint également la zone de torpeur (ou coma). Ici on trouve le point d'inhibition motrice ou point de

psychrotorpeur : l'activité est fortement ralentie jusqu'à son arrêt total (chill-coma) (Renault *et al.*, 1999). En dessous de cette zone, l'organisme est susceptible d'atteindre son point de congélation, c'est-à-dire la température à laquelle des cristaux de glace commencent à se former dans ses tissus. Le point de congélation (le point de surfusion, Supercooling Point, SCP) est la température la plus froide à laquelle les insectes intolérants au gel peuvent survivre et elle est variable selon l'espèce et les stades de développement (Fields, 1992). Cette température de cristallisation se détermine aisément car elle s'accompagne d'une brusque libération de chaleur latente (Lacoume, 2007). Les insectes meurent rapidement lorsque leur température corporelle passe au-dessous du point de surfusion. Les différences de sensibilité aux températures chez les insectes que l'on observe dans des résultats d'essais en laboratoire se trouvent dans le Tableau 2.

Tableau 2 - Réponse physiologique des insectes à la température (Fields, 1992)·

Zone	Température (°C)	Effet
Létale	50 - 60	Mort en quelques minutes
	45	Mort en quelques heures
Sous-optimale	35	Arrêt du développement
	33 - 35	Développement ralenti
Optimale	25 - 33	Taux de croissance maximale
Sous-optimale	13 - 25	Développement ralenti
	13 - 20	Arrêt du développement
Létale	5	Immobilité - mort en quelques jours (si non acclimaté)
	-10 à -5	Mort en quelques semaines ou mois (acclimaté)
	-25 à -15	Mort en quelques minutes (congélation)

· La réponse physiologique des insectes à des changements de la température extérieure est fonction de: l'espèce, du stade du développement, de la teneur en eau.

Réponse des insectes soumis aux basses températures

A cause de leur petite taille et de leur composition corporelle (70 % d'eau), les basses températures ont un effet délétère supérieur à celui des hautes températures sur les ectothermes (Denlinger et Lee, 1998). Quand on associe une température basse, un soudain changement de température et une courte période, immédiatement il y a des ajustements comportementaux et physiologiques (comme chill-coma, heat stupor) qui ont lieu chez les insectes (Hance *et al.*, 2007). Quand elle descend au-dessous du point congélation, elle entraîne des dommages irréversibles (Sinclair *et al.*, 2003). Les dommages causés par le froid débutent à des températures supérieures au point de congélation des fluides corporels et peuvent même commencer à températures positives (Sømme, 1999). Le niveau de tolérance au froid d'un insecte dépend de sa sensibilité thermique (Wilmer *et al.*, 2000). Plus la sensibilité thermique est élevée, plus la réponse de l'organisme à la moindre variation de température sera forte ; celà va engendrer de graves perturbations physiologiques et biochimiques et donc altérer la survie de l'individu (Lacoume *et al.*, 2007). Il existe de nombreuses théories sur les dommages biologiques engendrés par l'effet du froid : lipides figés, évolution de l'équilibre ionique et formation de cristaux de glace (Fields, 1992 ; Storey et Storey, 1989) ; mais aucun d'eux n'a pu être réellement vérifié au cours d'expériences en conditions contrôlées et elles pourraient être concomitantes (Fields, 1992).

Les dommages dus au froid peuvent provenir d'une altération des membranes plasmiques, de l'activité de certaines enzymes ou d'un bouleversement de l'homéostasie ionique (Ramløv, 2000 ; Renault *et al.*, 2004 ; Koštál *et al.*, 2006). Le froid diminue l'effet stabilisant des groupes hydrophobes des acides aminés composant une protéine, causant ainsi sa dénaturation (Hochachka and Somero, 2002). La dénaturation des protéines due au froid est souvent réversible (Franks, 1995). Cependant, certaines protéines peuvent être dénaturées de façon irréversible en formant des agrégats (Ramløv, 2000). Le problème structurel lié au froid est très différent pour les acides nucléiques. Les liaisons entre paires de bases, stabilisant la structure secondaire des acides nucléiques, se renforcent parallèlement à la diminution de la température (Issartel, 2007). Le froid peut donc engendrer des dommages aux protéines et aux acides nucléiques, en déstabilisant les unes et en stabilisant trop fortement les autres. L'action cumulée de ces dysfonctionnements peut provoquer un ralentissement de la synthèse protéique, jusqu'à son arrêt complet si la température devient trop basse (Grout and Morris, 1987).

Les dommages dus au froid sont souvent attribués à un déséquilibre dans l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme énergétique (Fields, 1992). Les réactions catalysées par des enzymes sont beaucoup plus lentes à basse température. L'activité de certaines enzymes est réduite plus que celle d'autres enzymes intervenant à d'autres étapes du métabolisme. Ceci cause un découplage de certaines réactions et l'apparition d'un déséquilibre physiologique aux étapes les plus freinées par le froid et cela entraîne une accumulation des concentrations anormales du substrat non-utilisé (Fields, 1992). Ainsi le métabolisme des ectothermes est par conséquent étroitement lié aux conditions thermiques de leur milieu de vie (Issartel, 2007).

Un autre mécanisme avancé pour expliquer les dommages causés par le froid est le déséquilibre de l'activité ionique des molécules (Fields, 1992). Par exemple, une baisse brutale de température de 35 à 0 °C double la solubilité de l'oxygène dans l'eau et augmente la concentration des ions hydrogène de 2,5 fois, sans changer le degré de solubilité du NaCl (Fields, 1992). Une forte concentration d'ions peut affecter la réaction enzymatique. Des changements mineurs dans le pH peuvent changer radicalement l'activité des enzymes. Les enzymes digestives seraient réduites de 20% uniquement dû aux changements de pH qui se produisent lorsque la température chute de 20 °C (équivalent à 0,34 unité de pH) (Houseman and Downe, 1981). Ainsi, lorsque la température environnementale diminue, l'ensemble des traits d'histoire de vie peut être altéré. Le ralentissement global du métabolisme va se répercuter sur des fonctions biologiques essentielles telles que la locomotion et la reproduction.

Face aux basses températures, on parlera d'abord de la survie des insectes. Au dessous du seuil thermique de développement, les séjours prolongés créent des conditions favorables à la mort des insectes (Fields, 1992). Lorsque la température s'approche du point de congélation, les insectes entrent dans un état comateux. Chez certaines espèces, abaisser la température de quelques degrés au-dessous de 0 °C a un effet mortel. Par exemple chez les fourmis rouges (*Solenopsis richteri, S. invcta, T. solenopsae* (Hymenopterere : Formicidae)), après 7 jours d'exposition à -4 °C, la mortalité est de 100 % (James *et al.*, 2002). Les effets cumulatifs du froid et de la durée d'exposition fragilisent souvent les insectes dont les taux de mortalité peuvent alors augmenter significativement (Bale, 1987, 1991). L'exposition des adultes *Rhyzopertha dominica* aux basses températures entraîne environ 95 % de mortalité et ce pourcentage a été atteint encore plus rapidement à 3 °C (Baldassari *et al.*, 2005). Chez *Cryptolestes ferrugineus,* les résultats d'une exposition pendant quelques semaines à -5, 0, 5,

10 ou 15 °C montrent une réduction de la survie des stades immatures entre 0 et 15 °C et 100 % de mortalité en moins de 2 semaines après une exposition à -5 °C (Barker, 1990).

La survie des insectes aux basses températures non seulement dépend tout d'abord de la température à laquelle ils sont exposés mais aussi du temps d'exposition (Denlinger et Lee, 1998). Par exemple, chez les *Dinarmus basalis*, une exposition à -18 °C pendant 15 minutes permet à l'ensemble des individus de se remettre de ce choc thermique, tandis qu'un doublement de cette durée provoque la mort des tous les mâles adultes (Lacoume *et al.*, 2007). Lors d'une exposition à basse température, les individus entrent en psychrotorpeur (chill-coma) (Vannier, 1987) et si le temps d'exposition devient trop long, les individus ne parviennent pas à se remettre totalement de la psychrotorpeur induite par le froid. Ils présentent des difficultés à se mouvoir (Lacoume *et al.*, 2007).

Les principaux moyens d'adaptation qu'ont les insectes pour survivre au froid consistent à éviter la congélation, ou à s'adapter. Les insectes qui évitent la congélation y parviennent en augmentant les concentrations de glycérol et de sucres dans leurs tissus de façon à abaisser leur point de congélation (Strang, 1997). Dans le cas des insectes qui tolèrent la congélation, la formation de glace dans leur organisme se fait de façon bien spéciale grâce à une protéine de nucléation présente dans leur fluide organique. Ils peuvent demeurer congelés pendant des mois, puis reprendre leurs activités une fois décongelés (Strang, 1997).

Les insectes parvenant à survivre après une exposition au froid, peuvent souffrir de dommages sub-létaux affectant le développement, la reproduction et la longévité (Hutchinson et Bale 1994). Si l'exposition au froid affecte les stades de développement larvaires, les adultes issus de ces larves peuvent aussi présenter des anomalies morphologiques qui empêchent le vol, s'opposent à l'accouplement ou rendent plus aléatoire la recherche de ressources trophiques (Bale *et al.* 1989, Lacoume *et al.*, 2007).

Les basses températures ont des effets négatifs non seulement sur la survie des larves et leur développement mais également sur la morphogénèse, la taille des adultes, et la sex-ratio (Sehnal, 1991). Le développement des insectes se fait par des étapes successives. Ils subissent de nombreuses transformations externes et internes pour compléter leur cycle de vie. La vitesse de développement des insectes afin de passer d'un stade à l'autre est fortement dépendante de la température (Liu *et al.*, 1995 ; Roy *et al.*, 2002). L'insecte ne peut pas se développer tant que la température n'atteint pas un certain seuil et cette valeur est différente

pour chaque espèce. Par exemple, chez les fourmis *Linepithema humile*, les œufs n'émergent qu'à partir de 18 °C (Abril *et al.*, 2010) mais chez *Thrips palmi*, ils émergent à partir de 10 °C (McDonald *et al.*, 1999). Chez *Tetranychus mcdanieli* un développement complet est obtenu à entre 14 °C et 36 °C. Cependant, il ne peut pas s'accomplir à des températures inférieures à 14 °C (Roy *et al.*, 2002).

Les basses températures peuvent affecter le développement des insectes à tous les stades (Denlinger et Lee, 1998). Sous l'effet de basse température letale, les œufs d'*Atrachya menetriesi se* divisent en multiples embryons (Miya et Kobayashi, 1974). Ou après un choc froid à -18 °C, environ 25 % de nymphes de *Dinarmus basalis* émergent avec des dificultés et une partie des individus meurt avant l'émergence (Lacoume, 2007). L'organisme ne peut pas se développer au-dessous de certaines températures (Dixon *et al.*, 2009). En général, le pourcentage de développement des insectes s'élève avec l'augmention de la température jusqu'à une température optimale et puis diminue (Jarosik et Honek, 2007 ; Wagner *et al.*, 1984). De plus, quand la température diminue, le temps de développement augmente. Par exemple, chez la coccinelle, *Adalia bipunctata*, le temps de développement se réduit lorsque la température augmente de 15 à 30 °C (Jalali *et al.*, 2010). Chez *Thrips palmi*, à 15 °C, il faut 42 jours pour un développement complet contre 10 jours à 30 °C (McDonald *et al.*, 1999). Un résultat semblable est obtenu chez *Stethorus punctillum* (Roy *et al.*, 2002). Le développement des insectes met en œuvre de nombreuses activités physiologiques différentes. L'énergie nécessaire pour ces activités provient des réactions chimiques qui se réalisent à l'aide des enzymes. Comme nous l'avons précédemment dit, les basses températures ralentissent l'activité des enzymes ou même les arrêtent.

Chez les insectes, pendant la phase immature, la période larvaire est divisée en plusieurs stades distinctifs (Esperk *et al.*, 2007). Les basses températures peuvent indirectement affecter la taille des adultes par l'influence variable du nombre de stades larvaires (Denlinger et Lee, 1998). Par exemple, chez *Ephestia kuhniella* à 25 °C il y a 5 stades larvaires mais à 18 °C, il n'y en a que 4 (Gierke, 1932). Comme un stade larvaire correspond à une période de nutrition et de croissance intense, la diminution du nombre d'étapes dans le développement des larves aboutit à la formation d'adultes de petite taille et à l'opposé, l'augmentation du nombre d'étapes aboutit à la formation d'adultes de grande taille (Denlinger et Lee, 1998).

Les basses températures ont également des effets négatifs sur la reproduction des insectes. Par exemple, l'exposition des femelles "Idianmeal moth" *Plodia interpunctella* à 10 °C pendant une longue période réduit énormément le nombre d'œufs pondus (Jonhson *et al.*, 1997). Un effet similaire a été trouvé chez *Chrysopa carneo* Stephens (Tauber *et al.*,1993). Les basses températures induisent une réduction de la prolifération des cellules gamétiques ou un blocage de la différenciation des spermatozoïdes au cours de la spermatogenèse (Giojalas et Catala, 1993 ; Cohet, 1973). Un choc froid à -18 °C pendant le développement peut provoquer une réduction de nombre de spermatozoïdes contenus dans les vésicules séminales chez les mâles de *Dinarmus basalis* (Lacoume, *et al.*, 2007).

De plus, les basses températures peuvent aussi modifier la sex-ratio (Laugé, 1985 ; Wrensch, 1993). La plupart des hyménoptères pratique la parthénogénèse arrhénotoque ; les femelles peuvent déterminer la sex-ratio de leur descendance en contrôlant la fécondation de chaque œuf (Kobayashi et Shimada, 2000 ; Wajnberg et Ris, 2007). A basse température, les *Ooencyrtus* ont tendance à produire des œufs non fécondés qui vont donner des mâles (Wilson et Woolcock, 1960). Dans le cas des fourmis *Formica rufa* la spermathèque n'arrive pas à libérer les spermatozoïdes à des températures en dessous de 19,5 °C, ainsi les œufs ne sont pas fécondés, et seulement des mâles sont produits (Gösswald et Bier, 1955).

Réponse des insectes soumis aux hautes températures

Les insectes sont sensibles aux hautes températures (Denlinger et Yocum, 1998). Selon l'échelle thermobiologique (Figure 2), lorsque la température dépasse le seuil qui assure une vitalité maximale, les fonctions vitales de l'insecte s'intensifient. Si la température continue à augmenter, une phase d'activités désordonnées se met en place afin de lutter contre le stress thermique (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001). Quand la température atteint la zone de torpeur, l'activité des insectes ralentit et s'arrête au point appelé « thermotorpeur ». Les insectes ne supportent pas les températures atteignant 60 °C pendant plus de quelques minutes (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001). Face à une élévation de température très importante, les insectes réagissent à différent niveaux d'organisation et plus particulièrement au niveau cellulaire. Pour Denlinger et Yocum (1998) trois niveaux de l'organisation cellulaire pourraient être perturbés par de hautes températures.

Le premier niveau est le microenvironnement cellulaire (pH et concentration ionique). Quand la température augmente, le pH diminue, ce qui provoque un stress acide et un changement de l'activité ionique. Ils peuvent être fatals à l'insecte si les mécanismes de régulation sont débordés (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001).

Le deuxième niveau de perturbation est de type moléculaire. Les températures supérieures au point de thermotorpeur modifient la structure, la forme et les propriétés fonctionnelles des protéines de l'insecte. Le changement le plus visible concerne la synthèse des protéines fonctionnelles. Quand il y a une augmentation soudaine de la température, la synthèse de celles-ci est interrompue et une nouvelle série de protéines, les protéines de choc thermique, sont exprimées (Denlinger et Yocum, 1998). De plus, à la température létale qui est comprise entre 50-60 °C, les protéines enzymatiques peuvent être dénaturées. Par exemple, le pyruvate kinase - une enzyme clé de la glycolyse pour la majorité des insectes - est inactivée en quelques minutes à la température létale (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001). Les autres enzymes ne sont pas forcement dénaturées par les mêmes niveaux de température ; mais ceux-ci causent rapidement des déséquilibres importants entre les réactions enzymatiques d'un même cycle métabolique. Il y a un découplage de ces réactions qui entraîne un blocage des réactions en chaine, en particulier dans le cas du métabolisme énergétique et de la chaîne respiratoire (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001).

Le troisième niveau de perturbation concerne la structure de la membrane cellulaire (Denlinger et Yocum, 1998). Les phospholipides membranaires deviennent beaucoup plus fluides à haute température (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001). Quand la température augmente, les changements des propriétés des lipides, de l'équilibre ionique, et le changement de la vitesse des réactions enzymatiques sont les causes physiologiques les plus probables de la mort des insectes (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001). De brèves expositions à des températures très élevées peuvent entraîner la mort immédiate (Denlinger et Yocum, 1998). Par exemple, quand on expose les œufs de cochenille *Paracoccus marginatus* à 37 °C, le pourcentage de survie est 0 % (Amarasekare *et al.*, 2008). Ou bien les œufs et les adultes de *T. castaneum* ne résistent que 30 minutes à 49 °C puis meurent (Grossman, 1931). La létalité est fonction de la température et du temps. C'est à dire que plus la température est élevée, plus la durée d'exposition nécessaire pour tuer les insectes est courte (Denlinger et Yocum, 1998). A 47 °C, il faut seulement 15 minutes pour avoir 100 % de mortalité des thrips, cochenilles et tordeuses (Cowley *et al.*, 1992). Chez *Caryedon serratus* ravageur des graines de niébé, à

67,5 °C, la mort intervient après une durée d'exposition inférieure ou égale à 10 minutes (Sembene *et al.*, 2006). Autant dire qu'une température létale n'a de sens que si on donne la durée d'exposition. Les températures élevées provoquent une mort rapide mais cela dépend aussi du stade de développement des insectes. Par exemple, la sensibilité à la température des œufs, des larves du quatrième stade et des adultes de bruche de l'arachide *Caryedon serratus*, a été testée dans une enceinte thermique entre 57,5 °C et 67,5 °C. Les adultes sont moins résistants à la chaleur par rapport aux autres stade de développement (Sembene *et al.*, 2006). Ainsi chez *T. castaneum*, une exposition à 49 °C pendant 30 minutes provoque la mort des œufs et des adultes mais une exposition de 45 minutes à une même température est nécessaire pour entrainer la mort des larves et de 180 minutes dans le cas des nymphes (Grossman, 1931). Apparemment, le stade adulte semble le moins tolérant malgré leur capacité de mobilité et le stade larvaire est le plus résistant à la chaleur.

Les hautes températures affectent également le développement des insectes. Selon une hypothèse proposée par Huey et Hertz (1984), la performance des insectes augmente avec l'augmentation de la température. En effet, la durée de développement des insectes est plus courte aux hautes températures qu'aux basses températures. Quand la température atteint la zone de thermotorpeur, elle peut modifier la structure ou bien dénaturer les protéines de l'insecte (Fleurat-Lessard et Le Torc'h, 2001). Ainsi le developpement de l'insecte est accéléré quand la température augmente jusqu'à une valeur limite, ensuite la vitesse de développement ralentira malgré l'augmentation de température (Jarošík et Honěk, 2007). Par exemple, chez les fourmis argentines *Linepithema humile*, la durée du stade œuf passe de 58 jours à 18 °C à moins de 15 jours à 30 °C. Par contre à 32 °C aucun œuf éclot (Abril *et al.*, 2010).

Chez les insectes, la reproduction est plus sensible aux stress thermiques que d'autres traits d'histoire de vie (Zizzari et Ellers, 2011) et c'est une activité extrêmement coûteuse en termes de temps, d'énergie et de ressources particulièrement pour les femelles (Harshman et Zera, 2007). Le choc thermique peut causer des altérations au niveau de la structure et de la fonction ovarienne mais également pour la maturation des ovocytes ; cela conduit à une diminution de la ponte d'œufs par les femelles (Mironidis et Savopoulou-Soultani, 2010). Les conséquences des chocs thermiques sur les fonctions de reproduction sont encore plus importantes quand le temps d'exposition est prolongé. Par exemple chez les femelles d' *Helicoverpa armigera*, après un choc thermique à 42,5 °C durant 30 minutes, la période de ponte est de 16,58 jours mais devient environ 5 fois moins importante lorsque la durée

d'exposition triple (Mironidis et Savopoulou-Soultani, 2010). Un résultat similaire a été montré chez *Trialeurodes vaporaiorum* (Cui *et al.*, 2008).

Lorsque la reproduction des insectes est affectée par les changements de température, les fonctions reproductrices des mâles sont généralement plus sensibles que celles des femelles (Giojalas et Catala, 1993, David *et al.*, 2005). L'augmentation de température réduit considérablement le délai de maturation sexuelle, ce qui représente un avantage pour l'insecte, dans la multiplication de ses effectifs (Minko, 2009). Chez *Drosophile mojavensis*, le stress thermique rend les mâles moins attractifs aux femelles en raison des changements dans la composition des hydrocarbures épicuticulaires (Markow and Toolson, 1990). A l'inverse chez les arthropodes comme *Orchesella cincta* le stress thermique entraîne une diminution des performances reproductive des mâles (Zizzari et Ellers, 2011). Chez *Drosophile buzzati*, l'augmentation de température traitement, en général, diminue la performance de reproduction des mâles. De plus, quand la durée de l'exposition au stress augmente, le nombre de descendants est diminué (Jørgensen *et al.*, 2006).

Il est reconnu que les changements climatiques ont des effets potentiels sur l'ensemble des paramètres individuels et populationnels des insectes. Ces effets pourront varier en fonction de l'espèce et de son habitat. Parmi les facteurs de ces changements, la température occupe une place prépondérante pour les organismes ectothermes car elle régule leur métabolisme. Toutefois, bien que les effets de la température sur les individus d'une espèce soient largement connus, les connaissances demeurent limitées quant aux conséquences sur leurs interactions. D'autre part si beaucoup d'études se sont intéressées aux femelles, peu se sont intéressées aux conséquences des variations de températures sur les capacités de reproduction des mâles.

Dans ce contexte, notre travail de thèse est plus particulièrement focalisé sur les effets de températures extrêmes (basses et hautes températures) sur les capacités de reproduction des mâles d'Hyménoptères parasitoïdes.

Avant d'aborder les études sur l'effet des variations de températures sur la capacité de reproduction des mâles d'hymenoptère parasitoide, nous avons effectué une étude connecte sur l'effet de la densité en hôtes sur la capacité de ponte des femelles d'*A. calandrae*. Cette étude nous amene, dans un premier temps à nous familiariser avec le modèle mais surtout de

connaître qu'elle était la pression de la densité en hôtes sur l'intensité de ponte des femelles mais également sur la sex-ratio de la descendance.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de stress thermique (froid ou chaud) appliqué au niveau de nymphe ou adulte sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae*.

Mode de vie des parasitoïdes

Les parasitoïdes représentent environ 8.5 % du total des espèces d'insectes décrites (Godfray 1994). La plus grande majorité appartient à l'ordre des hyménoptères avec environ 240 000 espèces (Bonet, 2002) et des diptères avec environ 16 000 espèces (Feener et Brown, 1997). Le terme « **parasitoïde** » a été introduit par Reuter en 1913 pour décrire une stratégie dans laquelle une partie de la vie d'un parasitoïde se développe au dépens d'un hôte (Godfray, 1994). Seul le stade larvaire de ces insectes est parasite, le stade d'adulte est libre. Le cycle de vie du parasitoïde cumule à la fois les caractéristiques des parasites et des prédateurs. En tant que parasites, il n'est besoin que d'un seul hôte pour accomplir leur développement. En tant que prédateurs, ils vont presque invariablement tuer leur hôte en cas de succès de l'attaque.

Les parasitoïdes se développent à l'extérieur d'un hôte (**ectoparasitoïde**) ou à l'intérieur d'un hôte (**endoparasitoide**). Ils sont qualifiés de **solitaires** lorsqu'un seul parasitoïde peut se développer par hôte, ou **grégaires** si plusieurs parasitoïdes se développent sur un seul hôte (Dubuffet, 2006). Une particularité de certains parasitoïdes est la **polyembryonie**. Les quelques œufs pondus se divisent asexuellement pour aboutir à l'émergence d'un grand nombre de parasitoïdes. Par exemple, la femelle adulte de *Copidosoma floridanum* pond un ou deux œufs dans son hôte (l'œuf d'une chenille noctuidé). L'œuf de parasitoïdes pondu se divise pour donner de l'ordre de 1500 descendants (Godfray 1994). Avec les parasitoïdes **idiobiontes**, la croissance de l'hôte est arrêtée après l'infestation. Par contre, elle peut encore continuer après l'infestation par les parasitoïdes **koïnobiontes** (Wajnberg et Ris, 2007).

Le stade de développement de l'hôte parasité est variable selon les espèces. Beaucoup de parasitoïdes pondent directement sur l'œuf ou sur la larve de leur hôte et certains parasitoïdes pondent leurs œufs sur leur hôte à d'autres stades de développement (pupe, adulte). Certaines

espèces sont également capables de parasiter différents stades de développement de l'hôte : œuf et larve, ou larve et adulte (Wajnberg et Ris, 2007). Le stade de l'hôte attaqué va permettre de distinguer les oophages (**parasitoïdes d'œufs**), les **parasitoïdes larvaires**, les **parasitoïdes des nymphes** et enfin, les **parasitoïdes imaginaux** qui attaquent les adultes (Tableau 3). A titre d'exemples, les Trichogrammes sont des parasitoïdes d'œufs de lépidoptères et de certains coléoptères (Delobel, 1989, Hoffmann *et al.*, 2001, Ranjith, 2007), *Bracon hebetor* Say est un parasitoïde spécifique de larves de lépidoptères (Altuntas, 2010), Nasonia est un parasitoïde de pupes de mouches (Desjardins *et al.*, 2010).

On distingue aussi les **parasitoïdes généralistes** qui s'attaquent à plusieurs espèces d'hôtes et les **parasitoïdes spécialistes** qui s'attaquent à une seule espèce d'hôte (Quicke, 1997). Par exemple *Anisopteromalus calandrae* est un parasitoïde généraliste qui s'attaque aux larves et nymphes de la plupart des espèces de Coléoptères ravageurs de graines (Ahmed, 1996).

Enfin, on distingue les parasitoïdes **proovigéniques** disposant de leur stock d'œufs matures complet dès l'émergence, les **synovigéniques** qui "maturent" de nouveaux œufs durant toute leur vie. Les œufs peuvent être hydropiques (dépourvus de vitellus) ou anhydropiques. La maturation des œufs chez les parasitoïdes synovigéniques produisant des œufs anhydropiques nécessite une source de protéine supplémentaire qu'ils trouvent dans l'haemolymphe de leur hôte.

Tableau 3 - Stade de devéloppement de l'hôte attaqué

Espèce	Stade du développement				Référence
	Œuf	Larve	Nymphe	Adulte	
Anisopterpmalus calandrae		x			Ahmed, 1996
Avetianella longoi	x				Hanks *et al.*, 1995
Bracon hebetor		x			Taylor, 1988
Cephalonomia stephanoderis	x	x	x	x	Lauzière, 1999
Cotesia rubecula				x	Siekmann *et al.*, 2004
Nasonia vitripennis			x		Danneels *et al.*, 2010
Telenomus podisi	x				Foerster *et al.*, 2004

Modèles Biologiques

La plante hôte *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Vigna unguiculata ou cowpea, ou niébé est originaire d'Afrique où l'on trouve une grande diversité génétique chez le type sauvage sur tout le continent, dans les zones de savane, du Burkina Faso, du Ghana, du Togo, du Bénin, du Niger, du Nigeria et du Cameroun. C'est une plante nutritive importante car ses graines sont très riches en protéines (Gueye, 1982). On la trouve également en Europe, en Asie et elle est largement cultivée aux Etats-Unis, aux Caraïbes et au Brésil. *V. unguiculata* est une espèce de plante du genre Vigna (Figure 3) de la famille des Fabaceae, dont plusieurs sous-espèces sont cultivées comme plantes alimentaires pour leurs graines, proches des haricots, ou pour leurs gousses (Figure 3).

Vigna unguiculata (L.) Walp
(Ooi Chooi Seng)

Graines saines

Figure 3 - La plante hôte *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Son cycle est très variable et dépend beaucoup de la température, la température optimale étant 35 ºC. Sous des climats secs, le niébé est presque entièrement autogame, mais dans les régions où l'humidité de l'air est élevée, la pollinisation croisée par les insectes peut avoisiner les 40 %. La longueur de la période de reproduction est très variable, les cultures les plus précoces demandant 30 jours depuis le semis jusqu'à la floraison, et moins de 60 jours pour produire des grains mûrs. Les cultures tardives à croissance indéterminée mettent 90 - 100 jours pour fleurir et jusqu'à 240 jours pour que les dernières gousses mûrissent (Pandey et Westphal, 1989).

Le niébé est très sensible à tout un éventail de maladies et de ravageurs et peut être attaqué à tous les stades de développement. Les insectes ravageurs constituent un facteur important limitant la production et la conservation du niébé et ils peuvent causer la perte totale de la récolte en graines. Ils peuvent être classés en trois groupes: ravageurs au stade de la préfloraison comme le puceron (*Aphis craccivora*) ; ravageurs au stade de la floraison - fructification comme les thrips des fleurs (*Megalurothrips sjostedti*) et enfin ravageurs des graines comme le bruche cosmopolite du niébé *Callosobruchus maculatus* (Huignard, 1985).

Les graines saines utilisées dans ce travail de thèse sont des graines sèches de *V. unguiculata* de la variété Black Eye California.

Le bruche cosmopolite du niébé *Callosobruchus maculatus* (Fab.)

Callosobruchus maculatus est un coléoptère Bruchidae de la famille Chrysomelidae. Cet insecte est de petite taille (environ 3mm de long; 1mm de large) et de couleur fauve. Un dimorphisme sexuel net au niveau de la coloration des élytres (ailes antérieures) et de la forme du pygidium (extrémité postérieure de l'abdomen), permet de distinguer les mâles des femelles (Do Thi Khanh, 2005) (Figure 4).

Callosobruchus maculatus (Fab.)

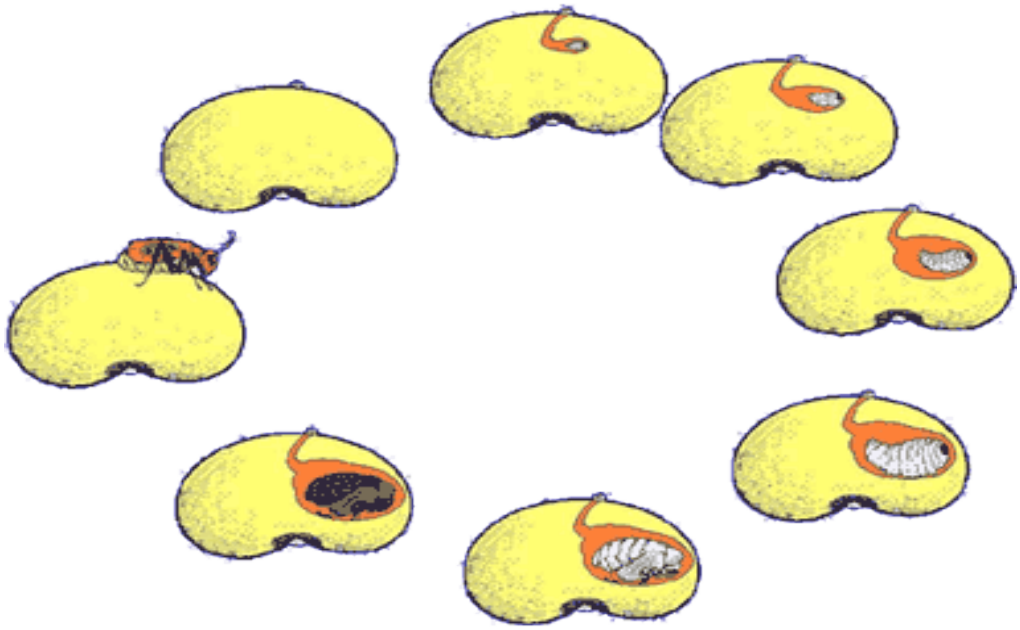
Les graines de niébé parasitées par *C. maculatus*

Figure 4 - Le bruche cosmopolite du niébé *Callosobruchus maculatus* (Fab.)

C'est une espèce généraliste qui peut attaquer de cinq à dix plantes hôtes. Ils peuvent se reproduire continuellement. Ils possèdent une large distribution géographique et attaquent un pourcentage de graines plus important que les spécialistes. Ils tolèrent de larges écarts dans le volume des graines et enfin leur taille est réduite (Demeure, 1985). L'origine de cette espèce est encore mal connue mais probablement africaine. *C. maculatus* est actuellement devenu cosmopolite, il provoque des dégâts importants aux réserves de graines d'espèces cultivées du genre Vigna avec une préférence pour *V. unguiculata*. Son activité est très réduite voire annihilée par le froid.

Son cycle de devéloppement varie entre 22 et 28 jours à 28 °C (Messina, 1993 ; Fox, 1993) (Figure 5). Après la ponte sur les gousses ou sur les graines de légumineuses, une minuscule larve mobile éclot, fore son chemin dans les tissus végétaux pour atteindre les cotylédons de la graine. Après 4 stades larvaires (de L1 à L4), la nymphose succède ensuite au stade physiologique de pré-nymphe et conduit à la formation de l'adulte. Le bruche effectuera tout son développement larvaire au sein de la graine (Do Thi Khanh, 2005).

La souche *C. maculatus* provenant du Burkina Faso est entretenue au laboratoire depuis 1991 sur des graines de niébé (*V. unguiculata*) dans une étuve à 40 °C : 25 °C, L12h : D12h, Rh 30 % (Do Thi Khanh, 2005). Nous mettons d'abord des graines saines en présence de bruches adultes mâles et femelles pendant 48 heures dans une chambre climatisée. Cela permet la ponte des femelles sur les graines. Les graines parasitées sont conservées en permanence dans la chambre climatisée jusqu'au 18ème jour pour permettre le développement des larves jusqu'au 4ème stade larvaire, L4. Ces graines contenant des larves de bruches sont alors séparées en deux parties. Une partie reste à l'étuve jusqu'à l'émergence des bruches adultes pour entretenir la souche de *C. maculatus* au laboratoire. L'autre partie est utilisée pour les élevages des parasitoïdes étudiés dans ce travail ; les graines sont alors enlevées de la chambre climatisée et placées au réfrigérateur à 4 °C pour stopper la croissance des larves et pour pouvoir être conservées pendant environ 7 jours. (Do Thi Khanh, 2005).



(© http://bmdtran.net)

Figure 5 - Le cycle du développement de *Callosobruchus maculatus*

Anisopteromalus calandrae (Howard) - un insecte auxiliaire pour la protection des stocks

Lorsque les insectes hôtes sont des ravageurs qui dévorent nos cultures, parasitent les animaux ou détruisent les stocks alimentaires, leurs parasites nous sont des auxiliaires bien utiles qui peuvent être utilisés dans la lutte biologique. L'utilisation des auxiliaires pour lutter contre les ravageurs est un principe connu et répandu depuis longtemps en production végétale. *Anisopteromalus calandrae* fait partie des auxiliaires qui sont utilisés pour la protection des stocks de graines de légumineuses (Figure 6).

Figure 6 - *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Lebreton, S.)

Anisopteromalus calandrae est un hyménoptère qui appartient à la famille des Ptéromalidés (Figure 7). Les adultes sont de couleur noire brillante. Ils présentent un dimorphisme sexuel pour la couleur de l'abdomen. Les mâles mesurent de 1,5 à 2 mm et présentent une absence de pigmentation à la base ventrale de l'abdomen. Les femelles mesurent entre 2 et 2,5 mm et leur abdomen est noir uniforme (Do Thi Khanh, 2005).

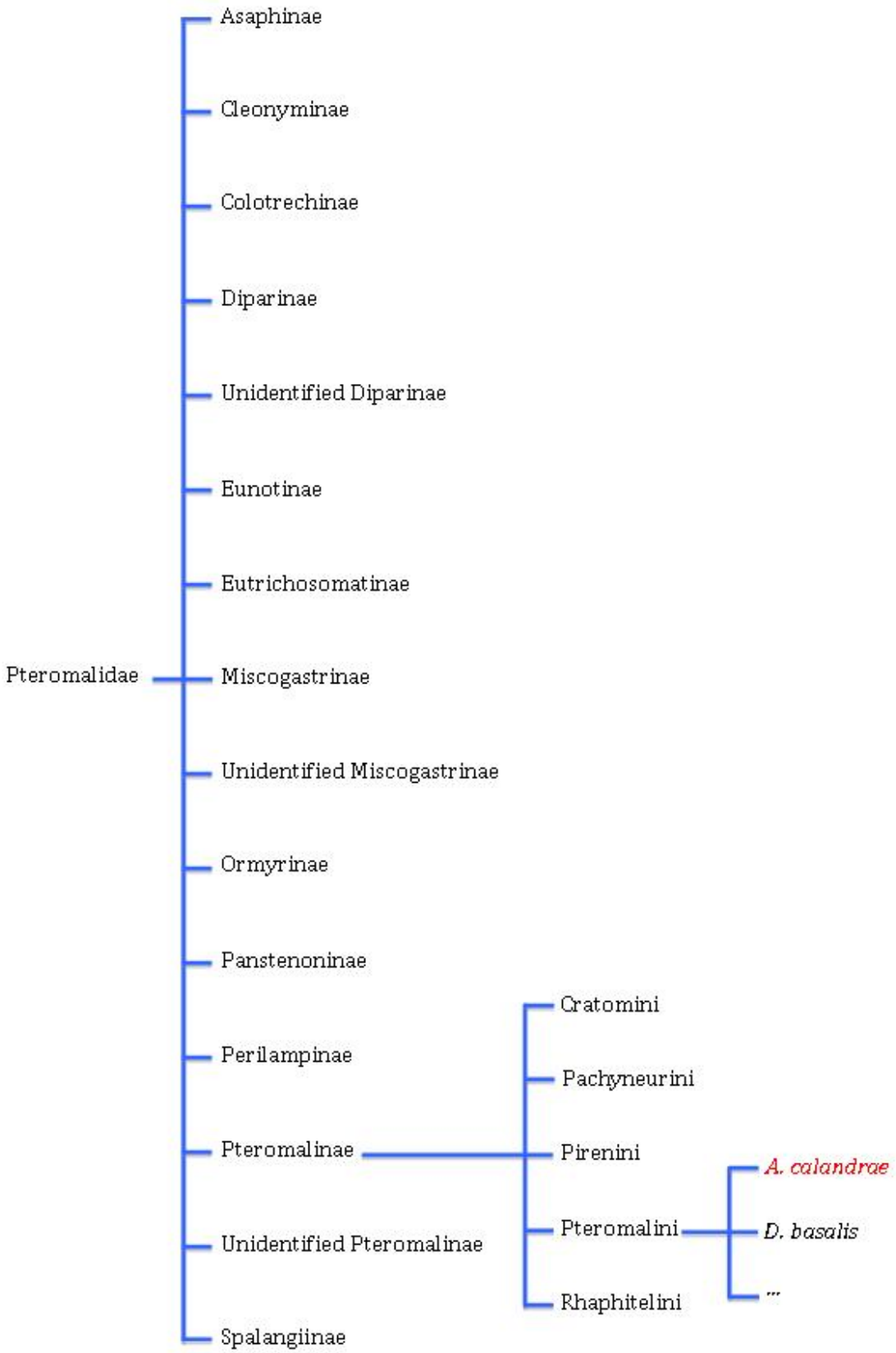


Figure 7 - La famille de Pteromalidae d'après Burks (1979)

C'est un parasitoïde généraliste qui s'attaque aux larves et nymphes de la plupart des espèces de Coléoptères ravageurs de graines. Il est utilisé pour lutter contre *Callosobruchus maculatus* (F) - un ravageur de graines de légumineuses (Ngamo *et al.*, 2007), *Rhzopertha dominica* - le petit perceur des grains (Menon *et al.*, 2002) ou bien plus contre *Sitophilus oryzae* (L.), *Lasioderma serricorn*, *Gibium psylloides* … Il fait partie des plus importants ennemis naturels des coléoptères granivores (Smith *et al.*, 1995). Par exemple, environ 96 % des bruchidés qui affectent des stocks de blé sont supprimés par l'utilisation de *A. calandrae* (Phillips *et al.*, 2003). 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 et Nargis, 1994; Ahmed *et al.*, 2006).

Les femelles sont capables de localiser les larves hôtes dans les graines (Arbogast et Mullen, 1990). 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 L4) grâce au marquage laissé par la femelle Coléoptère au moment de la ponte (Onodera *et al.*, 2002).

Une fois l'hôte repéré, elles courbent leur abdomen perpendiculairement à la graine de manière à positionner leur ovipositeur qu'elles introduisent ensuite dans la loge nymphale. Elles piquent alors l'hôte de l'extrémité de leur ovipositeur et injectent un venin qui le paralyse et arrête son développement. L'ovipositeur est retiré et ensuite introduit de nouveau pour déposer un œuf translucide allongé sur l'hôte ou près de celui-ci (Arbogast et Mullen, 1990). Les larves vont se développer à l'extérieur de l'hôte. Donc, cette espèce est un hyménoptère ectoparasitoïde et également un idiobionte : le développement de l'hôte s'arrête dès qu'il est parasité (Godfray, 1994).

L'éclosion s'effectue entre 30 et 31 heures après la ponte (Labarussias, 2005). Le développement comporte trois stades larvaires (Islam, 1993). La larve de parasitoïde est très mobile. Elle se déplace sur la surface de l'hôte et s'y accroche par ses pièces buccales. Au premier stade, la larve possède trois paires de stigmates (des orifices minuscules où arrivent les trachées respiratoires) tandis qu'aux deuxième et troisième stades, elle en possède neuf paires. La larve de bruche est totalement consommée après environ 7 jours et ensuite la larve de parasitoïde se transforme en nymphe. Dans cette période, elle est toute blanche donc nous la dénommons "nymphe blanche". Les nymphes chez cette espèce ont des membres, des ailes et des antennes libérés de l'enveloppe initiale (Islam, 1993). Le stade nymphal dure environ

une semaine avant l'émergence. Dans les conditions déterminées au laboratoire : 12 heures de jour à 33 °C et 50 % d'humidité puis 12 heures de nuit à 23 °C et 70 % d'humidité, les parasitoïdes adultes mâles apparaissent au bout de 14,3 ± 0,04 jours (n = 308) et les femelles au bout de 16,9 ± 0,1 jours (n = 208) (Do Thi Khanh, 2005). Dans d'autres conditions, la durée de développement chez *A. calandrae* peut varier ; par exemple, à 30 °C et 70 % d'humidité, la durée de développement est entre 10 et 11 jours (Islam, 1993). Cette espèce est protandre car les mâles émergent 1 jour avant les femelles (Islam, 1993) (Figure 8).

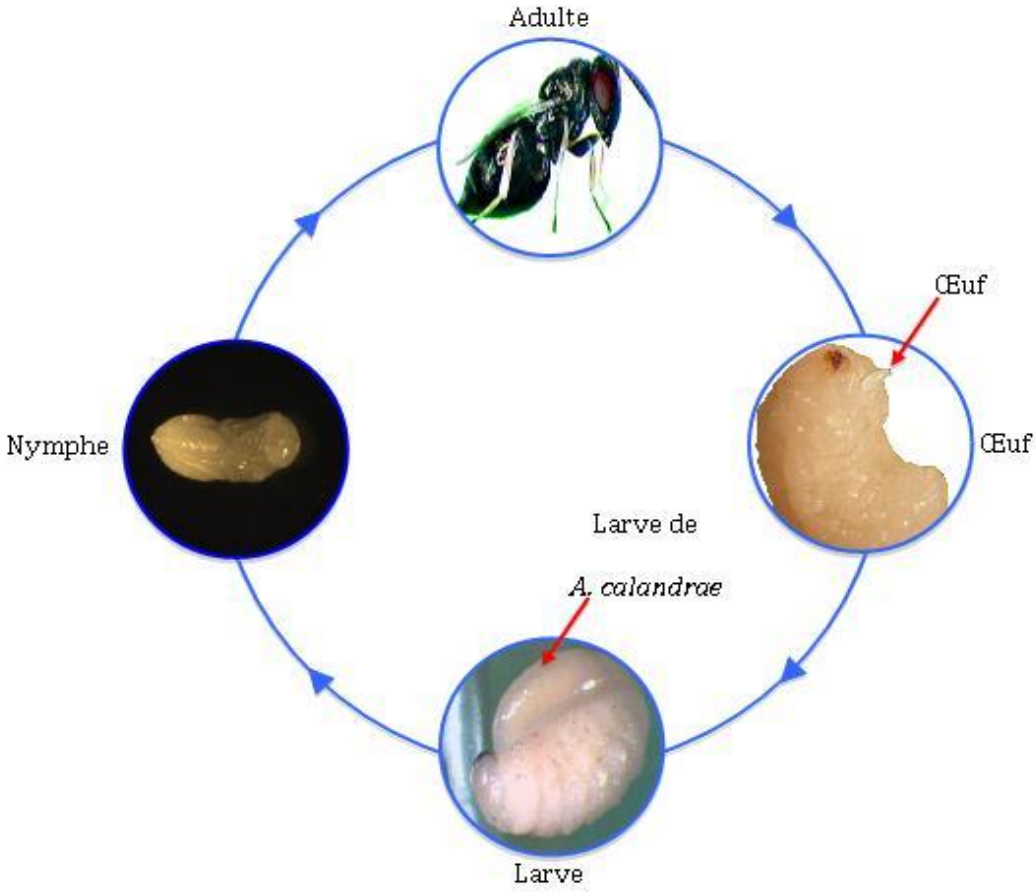


Figure 8 - Cycle du développement d'*Anisopteromalus calandrae*

Comme la majorité des hyménoptères, les femelles *A. calandrae* pratiquent la parthénogenèse arrhénotoque. Les œufs non fécondés donnent naissance exclusivement à des mâles et au contraire, les œufs fécondés donnent naissance à des femelles. Cette particularité de la reproduction des hyménoptères permet aux femelles d'avoir la capacité de contrôler le sexe de chaque descendant (en fertilisant ou non l'œuf pondu) et fait ainsi des hyménoptères parasitoïdes des modèles de choix dans l'étude de l'évolution de la sex-ratio.

La souche utilisée au laboratoire a été rapportée de Côte d'Ivoire en 2000. Les adultes à l'origine de cette souche proviennent de graines de *V. unguiculata* collectées sur un marché d'Abidjan en 2000 et ont été identifiés par Jean-Yves Rasplus (INRA de Montpellier, France). Les graines de *V. unguiculata* contenant des larves de *C. maculatus* sont placées dans quatre boîtes de pétri et mises à l'intérieur d'une cage d'élevage d'*A. calandrae* pendant 2 ou 3 jours, permettant aux femelles de pondre sur les larves. Les cages sont pourvues d'abreuvoirs contenant de l'eau sucrée. Les boîtes de pétri sont ensuite retirées et placées dans la chambre climatisée (30 °C, L12h : D12h, rh 50 %).

Après tamisage des boîtes d'émergence, on enlève les bruches non parasitées qui sont parvenues au stade imago. Ensuite, on vérifie toujours la couleur des yeux des individus sous la loupe binoculaire avant de les introduire dans les cages d'élevage pour éviter les mélanges entre la souche mutant rouge et la souche sauvage. Pour maintenir la population, la majorité des adultes est réintroduite dans la cage d'élevage. Les autres sont utilisés pour les expérimentations en fonction des protocoles.

Partie 1
Effets de la densité en hôtes

Avant-propos

La vie d'un parasitoïde dépend à la fois de facteurs biotique et abiotique différents comme, par exemple, la température, l'humidité, la recherche d'hôtes pour s'alimenter et pondre, la compétition entre parasitoïdes pour l'accès à un hôte. La relation entre hôte et parasitoïde a été bien étudiée et il existe une littérature abondante. Pour la majorité des parasitoïdes après la ponte, leur développement partiel ou total s'effectue dans (endo-parasitoïde) ou sur l'hôte (ecto-parasitoïdes). Il existe une relation complexe entre hôte et parasitoïde. Aujourd'hui il y a un regain d'intérêt sur la relation hôte - parasitoïde avec tout particulièrement un focus sur ce qui détermine les décisions de ponte des femelles. Ces décisions de ponte ont été utilisées comme un modèle pour tester diverses théories développées par les chercheurs travaillant sur l'écologie évolutive. Comme illustrés dans la Figure 9, plusieurs types de décisions ont été considérés par Waage et Godfray (1985) ; Charnov et Skinner (1985) se sont intéressés à différents aspects de l'évolution de la dimension des couvées, incluant des facteurs comme les conflits parents descendants. Waage et Godfray (Waage, 1979, 1982, 1986 ; Waage et Lane, 1984 ; Godfray, 1986, 1987) ont développé des modèles en relation avec la sélection de l'habitat, la dimension des couvées et la sex-ratio. Charnov et ses collaborateurs (Charnov, 1976, 1979, 1982, Charnov *et al.*, 1981 ; Charnov et Skinner, 1984, 1985) ont modélisé à la fois l'importance du régime alimentaire, la dimension des couvées, la sex-ratio et la sélection de l'habitat. Iwasa *et al.* (1984) et Green (1982) se sont intéressés au régime alimentaire tandis que Jervis et Kidd (1986) ont examiné la relation entre la qualité de l'hôte et le développement des descendants. Il existe également une littérature exhaustive sur la sex-ratio des parasitoïdes (Charnov, 1982). Une hypothèse commune à toutes ces études est que la sélection naturelle a façonné les décisions de ponte de telle sorte que celles-ci soient adaptatives (i.e. augmentation de la fitness) par rapport aux traits d'histoire de vie ou de contraintes.

Dans cette partie, nous allons chercher à savoir si la femelle d'un ecto-parasitoïde solitaire adapte sa décision de ponte en fonction de la densité en hôtes dans un patch de ponte. Y a-t-il une modification de la descendance et/ou de la sex-ratio ? Existe-t-il une modification de la qualité des descendants (taille, survie…) ?

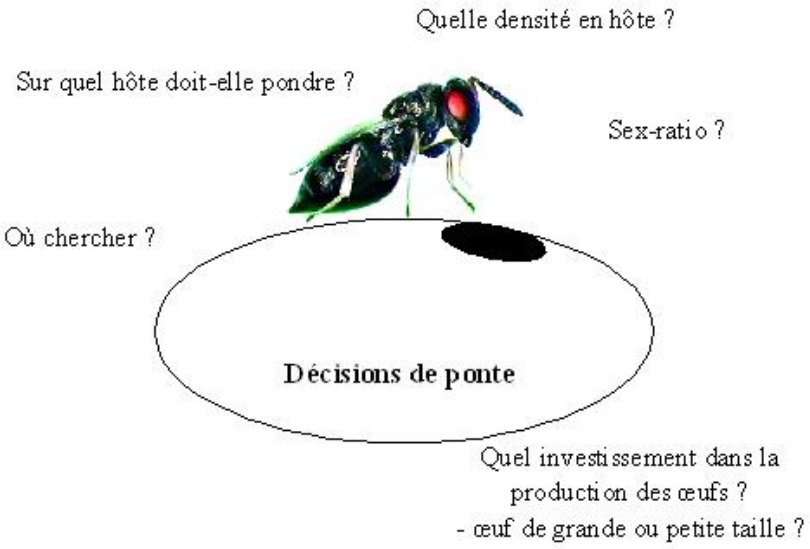


Figure 9- Les décisions d'une femelle avant de pondre ses œufs (d'après Charnov et Skinner, 1988)

Introduction

Chez les insectes, la relation hôte - parasitoïde est très intense. Le parasitoïde est obligé de trouver un hôte pour compléter la phase immature de son cycle de vie et cette infestation conduit à la mort de l'hôte. Cependant, les parasitoïdes sont dépendants de l'hôte qui représente la ressource nutritive indispensable au développement des parasitoïdes. Chez les parasitoïdes, seules les femelles adultes cherchent et attaquent des hôtes pour pondre leurs œufs. Donc pour se reproduire, les femelles parasitoïdes doivent être capables de trouver des hôtes qui conviennent au développement de leurs descendants. Le succès reproducteur des parasitoïdes est déterminé par de nombreux facteurs comme la qualité des hôtes et leur densité.

Les diverses caractéristiques des parasitoïdes vont avoir des conséquences importantes sur le comportement de la femelle parasitoïde, notamment sur sa stratégie de recherche et de sélection des hôtes. La plupart des parasitoïdes koinobiontes sont des endoparasites et beaucoup d'idiobiontes sont ectoparasites (Quicke, 1997). Les parasitoïdes idiobiontes possèdent généralement un spectre d'hôte plus vaste que celui des koinobiontes (tendance à être plus généraliste, en opposition à un parasitoïde spécialiste qui s'attaque à une seule espèce d'hôte) (Quicke, 1997). Les parasitoïdes koinobiontes diffèrent des idiobiontes dans le sens où ces derniers peuvent estimer, au moment de la ponte, la quantité de ressources disponible pour les œufs qu'ils vont y pondre. Ceci leur permet d'ajuster notamment leur taille de ponte (pour les parasitoïdes grégaires, Godfray, 1994) ou la sex-ratio de la descendance des femelles (Godfray, 1994 ; Quicke, 1997 ; Aung *et al.*, 2011) à la qualité de l'hôte attaqué (estimée par sa taille). La stratégie d'exploitation des hôtes par un insecte parasitoïde a un lien direct avec sa valeur sélective puisque l'efficacité de cette stratégie se mesure directement en nombre de descendants obtenus.

Une femelle parasitoïde adulte récemment émergée ne se trouve généralement pas à proximité d'hôtes à attaquer. Elle doit, dans un premier temps, partir à la recherche d'habitats potentiellement colonisés par des hôtes (Wajnberg et Ris, 2007) pour déposer ses œufs. Une fois le site de ponte trouvé, elle doit prendre au moins quatre décisions : 1) Sur quel hôte doit-elle pondre ? 2) Où pondre ses œufs ? 3) Combien en pondre dans chaque site ? 4) Quel sex-ratio de descendance assurer sur un hôte ? (Charnov et Skinner, 1985) (Figure 10).

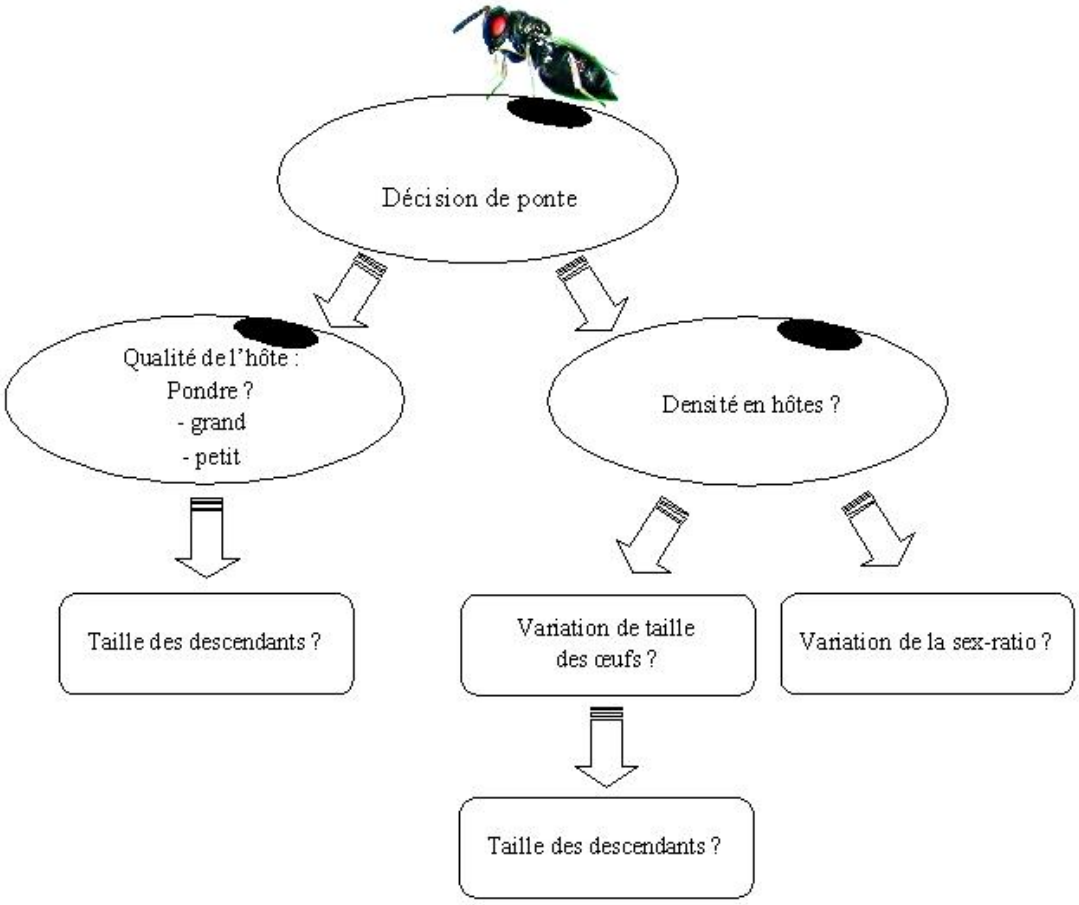


Figure 10 - Les conséquences de la décision de ponte d'une femelle sur les descendants

La taille du parasitoïde est influencée par la taille de l'hôte. La qualité nutritionnelle d'un hôte est l'un des principaux facteurs intervenant dans le choix du site d'oviposition, dans la mesure où elle affecte la performance larvaire (Choi *et al*, 2001 ; Smith, 1993 ; Thompson et Pellmyr, 1991). Quand la taille de l'hôte est trop petite, c'est-à-dire que la ressource alimentaire est insuffisante, le parasitoïde ne pourra pas se développer normalement et cela pourra entrainer sa malformation à l'émergence ou même sa mort (Lacoume, 2007). Donc plus la taille de l'hôte est grande, plus la taille des parasitoïdes est importante. Tillman et Cate (1993) montrent que les plus grands *Bracon mellitor* se développent sur les plus grandes hôtes *Anthonomus grandi grandis*.

Le nombre de descendants par site de ponte dépend souvent de la quantité des ressources disponibles pour chaque larve ou de la densité en hôtes. L'effet de la densité en hôtes influence différemment la stratégie de ponte des parasitoïdes solitaires et grégaires. La

femelle du parasitoïde solitaire ne pond qu'un seul œuf sur un seul hôte. A l'opposé, la femelle du parasitoïde grégaire peut pondre plusieurs œufs sur un même hôte. Par exemple, chez *Bracon hebetor* Say, idiobiont, ectoparasitoïde grégaire qui parasite des chenilles de nombreux ravageurs de céréales, le nombre de couvées est basé sur la densité en hôtes (Taylor, 1988 ; Yu, 2003 ; Işitan *et al.*, 2011). Par contre, le nombre d'œufs pondu par femelle est indépendant de la densité en hôtes (Taylor, 1988 ; Işitan *et al.*, 2011). Inversement, chez les parasitoïdes solitaires, par rapport au nombre d'hôtes, la femelle va limiter le nombre d'œufs pondus pour garantir le développement de ses descendants (Yu, 2003). Par exemple, chez *Anagyrus kamali* - endoparasitoïde solitaire, il y a une augmentation exponentielle du nombre total d'œufs pondus avec l'augmentation de la densité en hôtes (Sagarra *et al.*, 2000). Cependant, quand la densité en hôtes continue à augmenter, le nombre total d'œufs pondus à partir d'une certaine densité n'augmente plus et reste stable (Sagarra *et al.*, 2000). Ainsi, il existe une densité maximale en hôtes au-delà de laquelle la quantité d'œufs pondus n'augmente plus. La densité en hôtes peut limiter la production maximale de la descendance de parasitoïdes (Aung *et al.*, 2011). Les femelles parasitoïdes ont besoin de temps pour attaquer chaque hôte rencontré. C'est une contrainte qui limite l'impact des parasitoïdes sur la population d'hôtes quand la densité en hôtes est élevée (Wajnberg et Ris, 2007). De nombreuses études ont montré que les femelles pourraient moduler leur investissement dans la production d'œufs (e.g. en fonction de leur âge), un modèle qui reflète les contraintes physiologiques sur la production des œufs ou encore une stratégie adaptative (Begon et Parker, 1986 ; Clutton-Brock et Godfray, 1993 ; Bernardo, 1996 ; Roff, 2002).

Chez les hyménoptères à parthénogénèse arrhénotoque, les femelles peuvent déterminer la sex-ratio de leurs descendances en contrôlant la fécondation de chaque œuf (Kobayashi et Shimada, 2000 ; Wajnberg et Ris, 2007). Dans le cas d'une ponte, le parasitoïde doit déterminer le sexe de chaque descendant et le nombre d'œufs pondus pour les parasitoïdes grégaires (Godfray 1994) mais sa décision peut être influencée par la qualité des hôtes ainsi que leur densité (Charnov, 1981 ; Yu, 2003 ; Wajnberg et Ris, 2007). En fonction de la taille de l'hôte, les femelles parasitoïdes ajustent la sex-ratio de leur descendance (Charnov, 1979 ; Jones, 1982). Par exemple, chez le Braconidé *Heterospilus prosopidis*, les femelles pondent plus de fils quand la taille de l'hôte est petit et plus de filles quand la taille de l'hôte est grande (Jones, 1982).

L'augmentation de la valeur d'une activité se fait au préjudice d'une autre activité ; cela nécessite un coût car l'organisation est un système contraignant. La relation négative entre reproduction et survie en est un bon exemple. Il a été démontré, notamment chez un parasitoïde *Asobara tabida,* que l'augmentation du nombre d'œufs pondus entraîne une diminution de la durée moyenne de vie (Ellers *et al.*, 2000). Le coût en survie est le risque associé aux activités de reproduction (Barbault, 2008). Divers exemples étayent cette hypothèse, même s'il est vrai que, dans l'ensemble, l'information actuellement disponible sur ce point reste largement anecdotique. On conçoit bien sûr que des activités telles que la garde du nid chez les poissons ou les parades de distraction chez les oiseaux comportent des risques.

Dans cette partie, nous aborderons l'effet de la densité en hôtes sur les capacités de ponte des femelles d'*A. calandrae* et nous analyserons la sex-ratio de la descendance. Nous avons étudié quelques paramètres : la durée de vie de femelles mises en ponte, le nombre de descendants, la taille des descendants et enfin la sex-ratio de descendance.

Matériel et méthode

Obtention de graines parasitées

Trois mâles et sept femelles de *Callosobruchus maculatus* sont mis dans une boîte de Pétri contenant une centaine de graines de niébé (*Vigna unguiculata*). Cette boîte est placée dans une enceinte climatisée (36 °C : 70 %) pendant 12 heures. Après 12 heures, à l'aide de pinces souples, on élimine les bruches et on remet la boîte dans l' enceinte climatisée pendant 18 jours. 5 jours après la ponte, quand les œufs de bruche sont devenus solides, seules les graines contenant 1 ou 2 hôtes sont sélectionnées. Après 18 jours, on obtient des larves de bruches de stade L4 ou pré-nymphe (Gauthier, 1996). Le stade larvaire L4 est un stade où l'intensité de ponte des parasitoïdes est importante (Van den Assem *et al.*, 1984 ; Smith, 1993 ; Choi *et al.*, 2001). Les graines sont placées au réfrigérateur à 4 °C pour arrêter la croissance des larves et sont conservées au maximum pendant 7 jours.

Obtention de mâles et de femelles vierges

Pour obtenir des mâles et femelles *Anisopteromalus calandrae* vierges, nous tamisons des boîtes de graines en début de matinée afin d'enlever tous les individus qui ont émergé au cours des heures précédentes car ils pourraient s'être accouplés. Par la suite, nous isolons immédiatement les mâles et les femelles qui émergent des graines. Ensuite, les mâles et les femelles sont mis séparément dans des boîtes de Pétri (10 individus par boite) puis dans une chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %) pendant 24h (pour les mâles) et 2h (pour les femelles) avant de les faire accoupler. Dans ce travail, la rétention des individus correspond à une période pendant laquelle mâles et femelles ne sont pas mis en présence. Nous fournissons dans chaque boîte, comme nourriture, un coton imbibé d'eau sucrée (20 % de saccharose).

Accouplements

Les accouplements sont réalisés entre des mâles de 24 heures et des femelles de 2 heures. Dans de petites boites de Pétri (diamètre = 3 cm), un mâle et une femelle sont mis en contact. Ils sont surveillés jusqu'à l'accouplement.

L'accouplement est divisé en 2 stades. Tout d'abord, le mâle fait la parade (le mâle est sur le dos de la femelle et lui frotte les antennes). Puis, c'est la copulation. Elle dure environ 20 secondes (Do Thi Khanh *et al*, 2005) (Figure 11). Les femelles sont isolées des mâles après l'accouplement et conservées dans une boite de Pétri. Elles seront utilisées pour mesurer quelques traits d'histoire de vie et compter le nombre de descendants.

Figure 11 - Comportement d'accouplement chez *Anisopteromalus calandrae* entre un mâle aux yeux noirs et une femelle aux yeux rouges. Le morphe noir correspond à la souche sauvage ; le morphe rouge à la souche mutante (Do Thi Khanh *et al.*, 2005)

Mise en ponte des femelles accouplées

Après un accouplement simple, chaque femelle de *A. calandrae* était placée dans une boîte en plastique transparent contenant des graines - patch de ponte. Chaque graine contient une ou deux larves de *Callosobruchus maculatus* de 18 jours au stade larvaire L4. Nous avons constitué deux groupes avec des densités en hôtes différentes. Le premier groupe (groupe A) contient 2 graines (2 à 4 hôtes), le deuxième groupe (groupe B) contient 7 graines (7 à 14 hôtes) (Figure 12). Les graines sont collées en cercle au fond du patch à l'aide de patafix. Chaque jour, les femelles sont isolées et les patchs de ponte sont changés. La date de la mort des femelles durant la ponte est notée. En calibrant les hôtes, on évite une variation de la sex-ratio due à la taille des hôtes (Charnov, 1982). Les graines sont renouvelées chaque jour jusqu'à la mort de la femelle et stockées dans des boîtes de Pétri sur lesquelles sont notées le numéro de la femelle et la date de ponte. Les femelles en ponte et les graines sont récupérées après chaque journée de ponte et sont placées dans la chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %). Les femelles sont remises en ponte sur de nouveaux patchs de graines chaque jour.

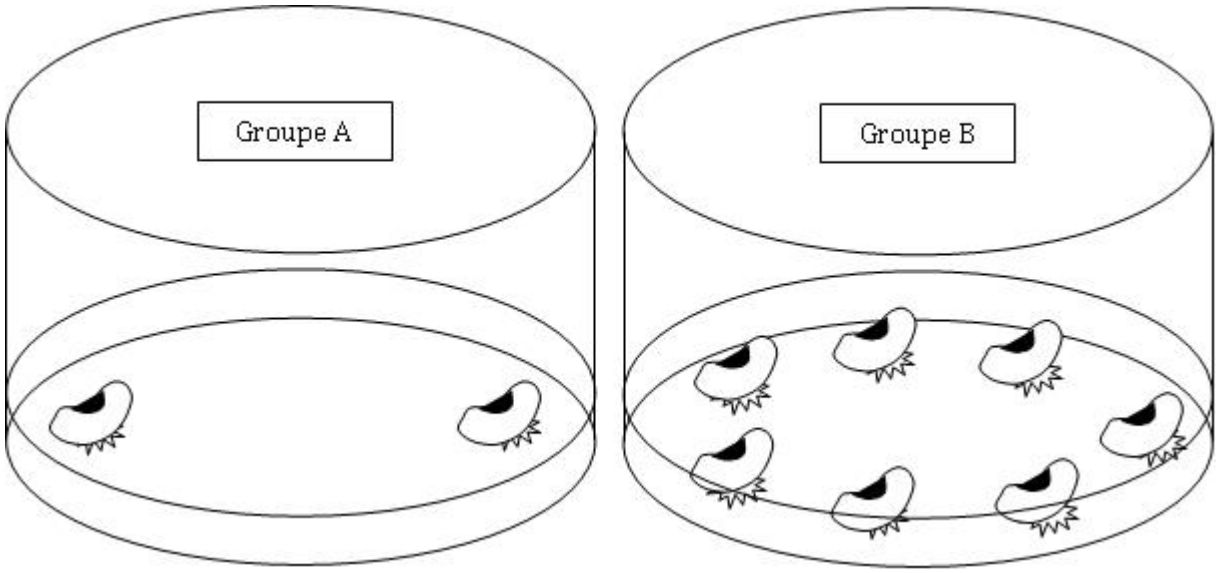


Figure 12 - Le système de patch de ponte

A l'émergence, les bruches non parasités qui sont parvenus au stade imago sont enlevés, le nombre de descendants mâles et femelles sont comptés pour chaque femelle parasitoïde. Les résultats sont reportés sur des fiches de suivi quotidien jusqu'à la fin de la période étudiée.

La mise en ponte de ces femelles accouplées ainsi que le suivi des descendants sont réalisés dans la chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %).

Les paramètres mesures sont (1) la durée de vie des femelles accouplées (2) le nombre de descendants, (3) la sex-ratio calculée comme étant la proportion de descendants filles sur la descendance totale, (4) la taille des descendants (mâles et femelles).

La durée de vie des femelles accouplées

Chez les espèces synovigéniques - les femelles émergent sans que tous les œufs soient matures. La maturation de nouveaux œufs est réalisée linéairement en fonction du temps sur la période de production (Jervis et Kidd, 1986). Elles doivent donc s'alimenter afin d'obtenir les nutriments essentiels au développement ovarien et exprimer leur capacité reproductive maximale (Jervis et Kidd, 1986). Pendant l'expérimentation, les femelles sont nourries avec une solution de saccharose à 10 % et la date de leur mort est notée.

Le nombre de descendants

Les graines parasitées par les femelles de parasitoïdes sont conservées dans la boîte de Pétri et sont gardées en chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %) en attendant l'émergence. Le nombre de descendants émergés est noté chaque jour.

La sex-ratio

$$\text{Sex ratio} = \frac{\Sigma ♀}{\Sigma ♀ + \Sigma ♂}$$

Taille de la descendance

La largeur de la tête est une des mesures permettant d'avoir une estimation du poids des insectes. En comparant le poids des mâles et la largeur de leur tête 24 heures après leur émergence, Lacoume (2007) a montré que plus la largeur de la tête augmente, plus le poids du mâle est élevé (Figure 13) et cette largeur peut être utilisée comme estimateur du poids des individus.

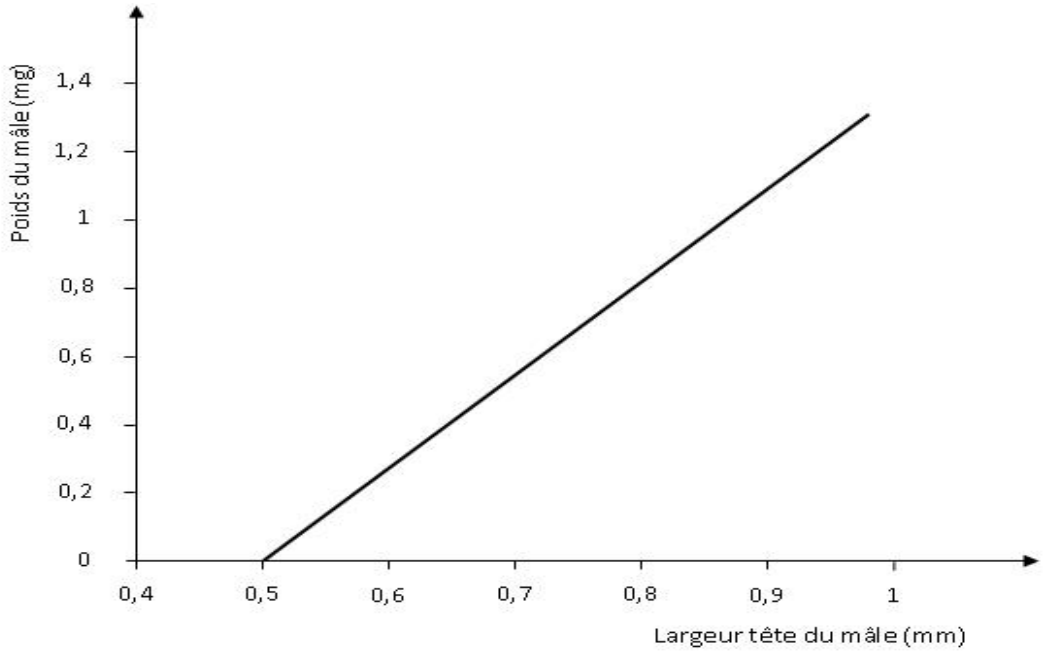


Figure 13 - Evolution de la largeur de la tête du mâle en fonction de son poids frais (d'après Lacoume *et al.*, 2006)

Nous utiliserons cette méthodologie pour estimer le poids des descendants (mâles et femelles). Un système micro-vidéo photographique (microscope optique-camera-ordinateur) nous permet de photographier la tête des descendants et la largeur des têtes a été mesurée par le logiciel d'analyse d'image NIH - Image J.

Analyses statistiques des données

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard (M ± ES). Le logiciel R est utilisé pour les traitements statistiques. Un test ANOVA est utilisé pour comparer l'ensemble des données. La signification retenue est toujours $p < 0,05$. La normalité des résultats a été vérifiée pas le test de Shapiro-Wilk.

Le t-test Student est utilisé pour la comparaison entre deux nombres moyens de données (la taille de descendants et nombre de descendants) et est remplacé par le test de Wilcoxon si les données ne suivent pas une loi normale. Pour la comparaison entre les deux proportions indépendantes ou entre les sex-ratios, le test du Chi^2 a été utilisé. Pour les courbes de survie, le Log-Rank test a été utilisé.

Résultats

La durée de vie des femelles accouplées

Dans cette étude, dans les mêmes conditions contrôlées, la durée moyenne de vie des femelles *A. calandrae* accouplées une fois est affectée par la densité en hôtes. La durée de vie des femelles qui pondent dans des patchs de forte densité en hôtes est en moyenne supérieure de 2 jours par rapport à celles qui pondent sur des patchs de plus faible densité en hôtes. 50% de mortalité est atteinte au bout de 15 jours dans les patchs (A) et de 17 jours dans les patchs (B). Toutefois, cette survie entre les deux densités en hôtes n'est pas significativement différente (Log.Rank test : df = 1 ; $Chi^2 = 1,14$; $p > 0.05$) (Figure 14).

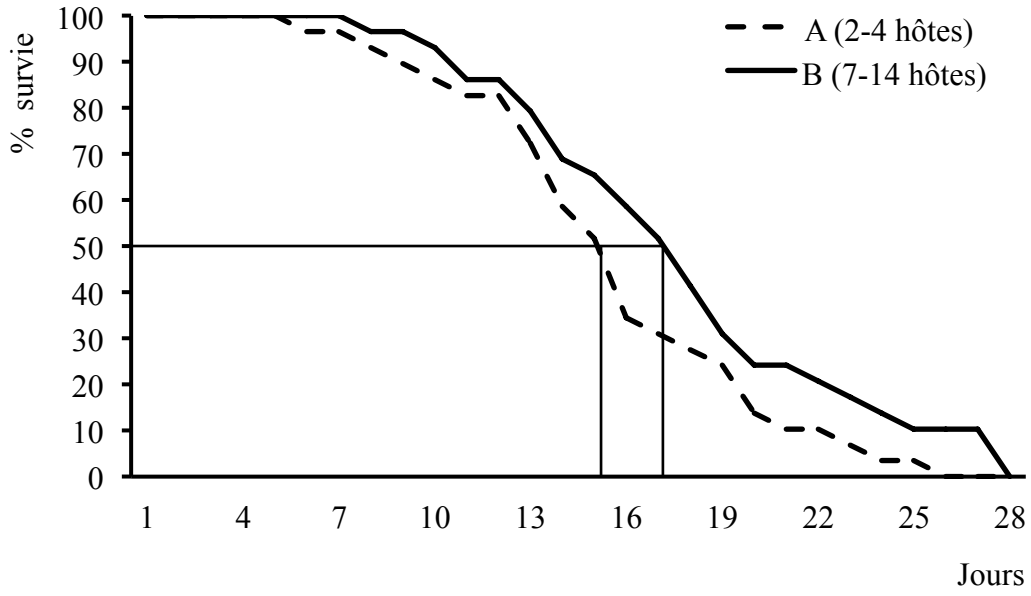


Figure 14 - La survie des femelles d'*A. calandrae* accouplées en fonction de la densité en hôtes

Nombre de descendants

La descendance et la sex-ratio des femelles mises en ponte dans des patchs de deux densités en hôtes différentes sont présentées dans la Figure 14. Les femelles pondent en moyenne pendant 22 jours. Le nombre total de descendants produit par femelle durant la durée de ponte varie significativement en fonction de la densité en hôtes (ANOVA : $df = 1$; $F = 19,753$; $p < 0,05$). Il est environ 3 fois plus important sur les patchs à 7 graines que sur les patchs à 2 graines. Le nombre total de descendants par femelle est en moyenne de

31,7 ± 1,53 (704 filles ; 152 fils) pour les femelles du groupe A (2 graines) et de 106,57 ± 6,1 (2179 filles ; 805 fils) pour les femelles du groupe B (7 graines). Toutes les femelles sont mortes après 28 jours (Figure 15).

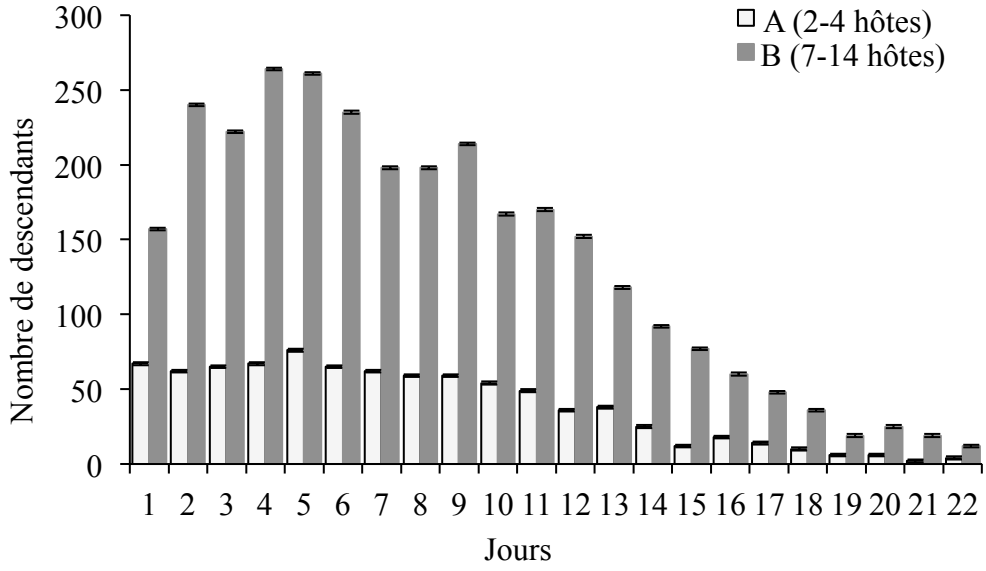


Figure 15 - Le nombre moyen quotidien de descendants en fonction de la densité en hôtes sur la durée de ponte des femelles

La sex-ratio et le nombre de descendants en fonction de la densité en hôtes que nous reportons proviennent des femelles accouplées utilisées dans l'expérimentation. Les descendants étaient comptés chaque jour pour chaque femelle en fonction de la densité en hôtes et les individus étaient classés par sexe à l'émergence.

Sur la durée de ponte, quelle que soit la densité en hôtes, la sex-ratio est fortement biaisée en faveur des femelles (Figure 16). Cependant celle-ci est significativement plus faible lorsque la densité en hôtes augmente (0,82 *vs* 0,73 ; $df = 1$; $Chi^2 = 30,22$; $p < 0,05$).

La proportion de mâles augmente plus en fonction du temps dans les patchs de forte densité en hôtes que dans ceux de faible densité en hôtes (Figure 16). Cette différence est significative (*t.test*, $p < 0.05$).

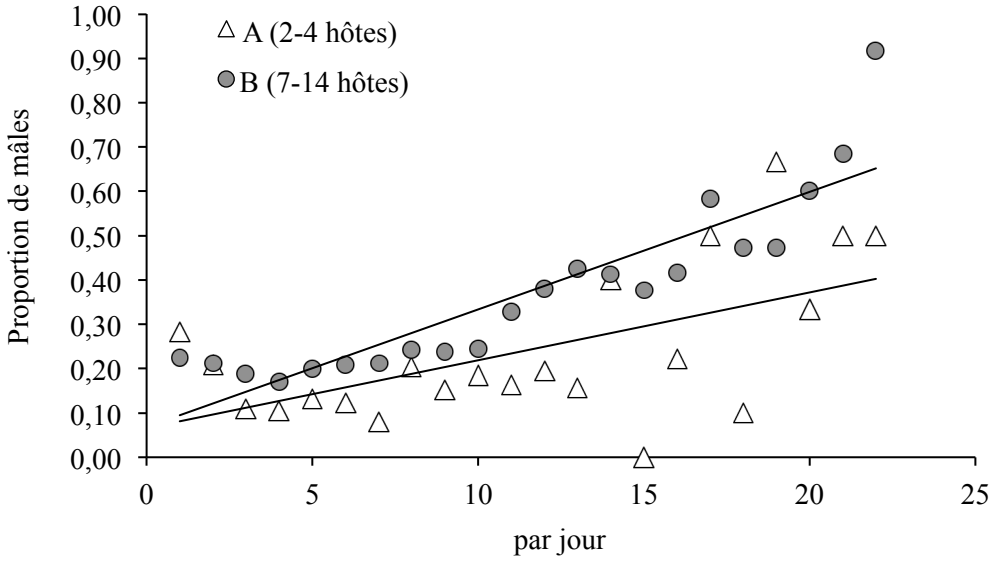


Figure 16 - Proportion de mâles produits chaque jour en réponse à la densité en hôtes dans les patchs de ponte (y = -0.0153x + 0.0658, $r^2 = 0.3384$ pour les patchs A (2-4 hôtes) ; y = -0.0265x + 0.0683, $r^2 = 0,805$ pour les patchs B (7-14 hôtes) ; *t.test*, $p < 0.05$)

Nous avons comparé les pentes de régression en fonction du nombre d'hôtes dans les patchs. Dans les deux cas, nous avons une relation négative entre la sex-ratio et le nombre de descendants dans les patchs. Il existe une différence significative entre les deux courbes de régression (*t.test*, $p < 0.05$). Plus la densité en hôtes dans les patchs est importante, plus la relation négative entre la sex-ratio et le nombre de descendants est forte ($r^2 = 0{,}7661$ *vs* $r^2 = 0{,}3502$, $p < 0.05$). Plus le nombre de descendants dans les patchs est élevé, moins de nombre de mâles est important (Figure 17).

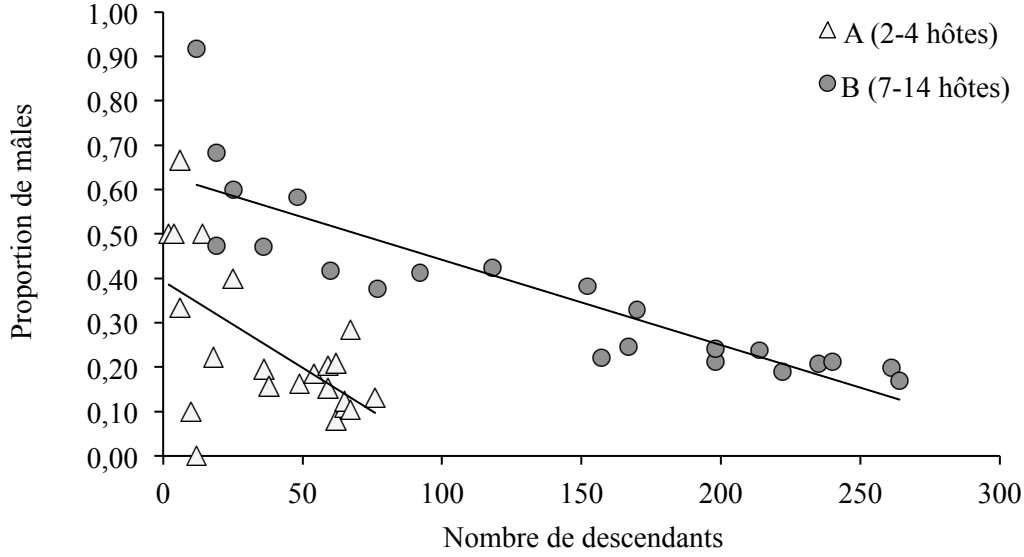


Figure 17 - Proportion de mâles produits dans la descendance globale
($y = -0.0039x + 0.3937$, $r^2 = 0.3502$ pour les patchs A (2-4 hôtes) ;
$y = -0.0019x + 0.6336$, $r^2 = 0{,}7661$ pour les patchs B (7-14 hôtes) ; *t.test*, $p < 0.05$)

Taille de la descendance

Dans cette étude, la taille moyenne des descendants des femelles qui pondent dans des patchs de densité en hôtes faible et forte est significativement différente (ANOVA: $df = 3$; $F = 158{,}98$; $p < 0{,}001$. Figure 18). Quel que soit leur sexe, les descendants des femelles qui pondent sur des patchs de faible densité en hôtes sont significativement plus grands que ceux des femelles qui pondent sur des patchs de forte densité en hôtes (pour les femelles : 0,83 *vs* 0,81 ; *t.test* : $df = 196{,}79$; $p < 0{,}001$: pour les mâles : 0,75 *vs* 0,72 ; *t.test* : $df = 184{,}351$; $p < 0{,}001$).

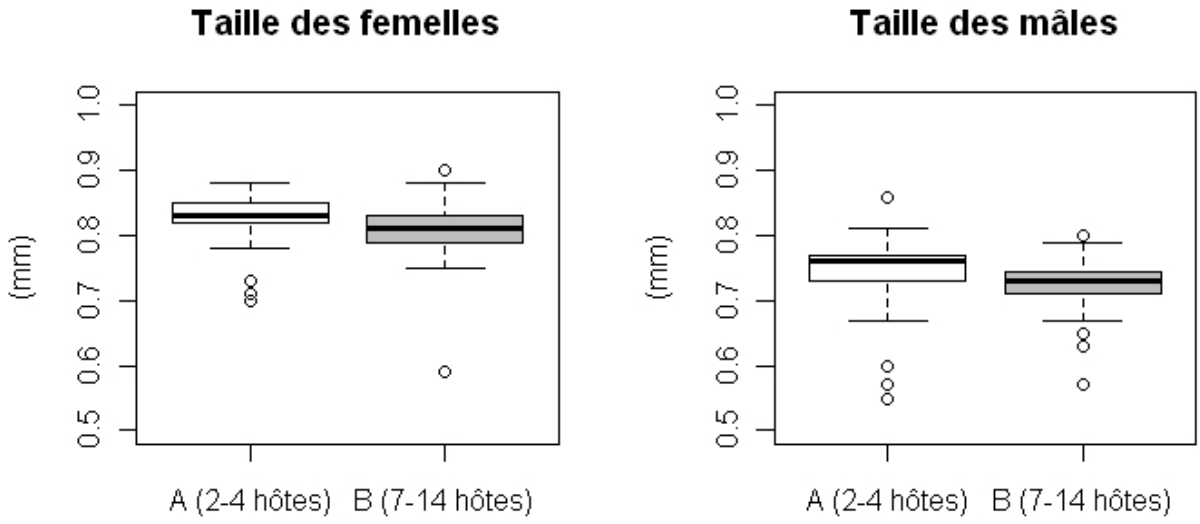


Figure 18 - Comparaison de la taille de descendants en fonction de la densité en hôtes

Discussion

La densité en hôtes est un des facteurs déterminants de la stratégie de ponte des femelles d'hyménoptères et de l'ajustement de la sex-ratio de la descendance (Aung *et al.*, 2011). Chez *A. calandrae*, après un accouplement, nous voyons que les femelles vont adapter leur ponte en fonction de la densité en hôtes dans les patchs avec comme conséquence une évolution à la fois de la sex-ratio et de la taille de descendants.

Effet de la densité en hôtes sur la décision de ponte des femelles

La femelle parasitoïde doit prendre plusieurs décisions comportementales pour son approvisionnement en hôtes et chacune de ces décisions pourra affecter directement la production de descendants. Premièrement, elle doit chercher et sélectionner les hôtes susceptibles de recevoir ses œufs et d'assurer le développement larvaire. Mais la distribution des hôtes peut varier sur le terrain et tout au long de la vie de la femelle et devenir une forte contrainte biologique qui peut affecter les performances de ponte des parasitoïdes (DeBach et Smith, 1941 ; Corley, 1999). Dans cette étude, deux densités en hôtes ont été imposées pour tester la décision de ponte des femelles et le résultat a bien montré une différence d'investissement dans la quantité d'œufs pondus entre les deux densités en hôtes. Elles pondent davantage quand la densité en hôtes est plus importante. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par DeBach et Smith (1941). Ils ont montré chez deux espèces de Ptéromalidae que le nombre d'hôtes attaqués par les parasitoïdes augmente lorsque la densité en hôtes augmente. Cela a été aussi bien décrit chez *Spalangia cameroni*, *S. endius*, *Muscidifurax raptor* et *Nasonia vitripennis* (Legner, 1967). Les organismes auxiliaires ont des caractéristiques démographiques liées à celles de leurs hôtes (Schiffers et Wainwright, 2011). Autrement dit, la présence des organismes auxiliaires dépend de celle de leurs hôtes. S'il n'y avait pas d'hôtes, il n'y aurait pas d'auxiliaires. Pour cette raison, il y a toujours recherche d'un équilibre entre ces deux populations. Ce mécanisme de régulation naturelle permet que les deux populations puissent exister et se développer en parallèle.

A. calandrae est un parasitoïde solitaire, une seule larve peut se développer sur un hôte. Il est donc logique que dans notre étude, lorsque la densité en hôtes est moins importante (2-4 hôtes par patch de ponte) il y ait moins de descendants que lorsqu'elle est plus forte (7-14 hôtes par patch de ponte). Même si la femelle décide de pondre plusieurs œufs sur le même hôte dans les patchs de faible densité, au final, un seul descendant émergera. En effet, lorsque plusieurs œufs sont pondus sur un même hôte, soit ils sont éliminés par une larve déjà présente, soit les larves se battent dans le cas où plusieurs œufs sont parvenus à éclore (Quicke, 1997). Donc, pour éviter un combat larvaire mortel, les femelles sont capables de vérifier si l'hôte est déjà parasité (Lebreton, 2009). Cette capacité a été étudiée chez de nombreuses espèces différentes comme *Dinarmus basalis* (Gauthier *et al.*, 1996) ; *Cephalonomia stephanoderis* (Barrera *et al.*, 1994) ; *Ooencurtus nezarae* (Takasu et Hirose, 1998). Les femelles peuvent détecter la présence d'œufs conspécifiques à la surface

des hôtes parasités grâce à plusieurs signaux physiques ou chimiques ou bien en se reproduisant sur des hôtes vivant en patchs. Elles peuvent également marquer le patch entier après avoir parasité un hôte (Hoffmeister et Roitberg, 1997 ; Lebreton, 2009). Ces travaux montrent que la densité en hôtes affecte la décision de ponte de la femelle parasitoïde.

Effet de la densité en hôtes sur la sex-ratio des descendants

La majorité des parasitoïdes hyménoptères est haplo-diploïde. La forme la plus connue est la parthénogénèse arrhénotoque dans laquelle les mâles se développent à partir des œufs non fertilisés (haploïdes) tandis que les œufs fertilisés donnent des femelles (diploïdes). Cette particularité de la reproduction des hyménoptères donne aux femelles la capacité de contrôler le sexe de chaque descendant en fertilisant ou non l'œuf pondu. La distribution du sexe des descendants est souvent en corrélation avec la taille de l'hôte considérée comme un indicateur de sa qualité (Charnov, 1979 ; Godfray 1994 ; Ueno, 1999 ; Wajnberg et Ris, 2007). En particulier, elle est très importante chez les parasitoïdes idiobiontes et solitaires comme *A. calandrae* qui ne consomment qu'un seul hôte. Mais la sex-ratio des descendants dépend aussi de la densité en hôtes, ce que confirment nos résultats. Dans notre étude, nous avons montré que lorsque la densité en hôtes dans les patchs augmente, la sex-ratio est de moins en moins biaisée en faveur des femelles. De nombreuses études ont démontré que les femelles produisent plus de filles en début de vie reproductive et plus de mâles lorsque leur stock de spermatozoïdes est épuisé (Damien, 2001; Do Thi Khanh *et al.*, 2005; Lacoume *et al.*, 2007). Ainsi les femelles d'*A. calandrae* pourraient varier leur investissement dans l'utilisation de leur stock de spermatozoïdes, un modèle reflétant des contraintes physiologiques sur la fertilisation des œufs ou encore une stratégie adaptative liée à la densité en hôtes. Nos résultats confirment que les femelles de parasitoïdes peuvent contrôler le sexe de leurs descendants (King, 1993). Lebreton *et al.* (2010) ont montré également que les femelles *A. calandrae* produisaient plus de mâles en fin de vie reproductive.

Cependant, la relation entre la densité en hôtes et la sex-ratio des descendants varie selon l'espèce (King, 1987). Par exemple, chez *Spalangia endius*, la densité en hôtes n'affecte pas la sex-ratio des descendants (Donaldson et Walter, 1984). Au contraire, chez *Aphidius ervi*, la sex-ratio des descendants est complètement modifiée lorsque la densité en hôtes change (He *et al.*, 2006).

En accord avec Werren (1984) et King (1993), nous trouvons une relation négative entre la sex-ratio et la dimension des couvées. Cependant, cette relation est significativement plus forte quand la densité en hôtes augmente. La relation négative entre la proportion des fils et la descendance en réponse à la densité en hôtes dans le patch pourrait être adaptative comme cela est expliqué par le modèle théorique de « local mate compétition » (Werren, 1980).

Effet de la densité en hôtes sur la taille des descendances

Nous avons montré que lorsque la densité en hôtes dans les patchs doublait, la taille des individus (mâles et femelles) diminuait de manière significative. De nombreuses études ont montré que la taille des parasitoïdes est dépendante de la qualité nutritionnelle d'un hôte (Yu *et al.*, 2003 ; Tillman et Cate, 1993, Ellers et Jervis, 2003). Cela est d'autant plus important chez les parasitoïdes idiobionts où l'hôte ne croît plus après parasitisme (Godfray, 1994). Toutefois, dans notre étude, la qualité de l'hôte ne peut pas être évoquée pour expliquer la plus faible taille des individus. La taille des hôtes était standardisée pour éviter la différente de qualité de l'hôte et ainsi éviter des effets cumulés de notre système expérimental sur la stratégie adaptative des femelles.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les individus de plus petite taille proviendraient d'œufs de plus petite taille. Cela indiquerait qu'*A. calandrae* pourrait varier son investissement par œuf en fonction de la densité en hôtes rencontrée dans les patchs de ponte. Fox et Mousseau (1996) ont montré que la taille des œufs détermine la taille des descendants. Les descendants qui émergent de gros œufs sont plus grands et survivent mieux que ceux qui émergent de petits œufs (Fox, 1994). Par ailleurs, la taille des œufs est également fonction de l'âge des femelles mais aussi du temps qu'investissent les femelles dans la production des œufs (Ellers et Jervis, 2003). *A. calandrae* est une espèce synovigénique. Les ovaires contiennent peu d'ovocytes matures à l'émergence et l'ovogenèse se poursuit durant toute la vie adulte.

L'investissement reproductif est un facteur essentiel dans l'étude des traits d'histoire de vie (Smith et Fretwell, 1994 ; Charlesworth, 1980 ; Perrin et Sibly, 1993, Einum et Fleming, 2000 ; Roff, 2002). Il a été montré que la dimension des œufs était un des prédicateurs majeurs de l'investissement reproductif des femelles (Winkler et Walkin, 1987 ;

Sinervo et Licht, 1991 ; Bernardo, 1996). En outre, Giron et Casas (2003) ont montré que la dimension des œufs est un bon prédicateur de la fitness des descendants. Plusieurs études ont démontré que les femelles pourraient varier leur investissement par œuf en fonction de l'âge mais également en fonction de la densité en hôtes. Nous pouvons penser que les femelles passeraient moins de temps pour la maturité de leurs oeufs car elles devraient en passer d'avantage à la recherche des hôtes.

Ainsi, si les femelles d'*A. calandrae* diminuent la dimension et le contenu des œufs en fonction de la densité en hôtes, nous pouvons penser qu'une variation de l'investissement par œuf pourrait avoir des répercussions importantes sur la fitness des descendants.

Partie 2
Effets du stress thermique

Avant - propos

Chez les ectothermes, la température corporelle influence les performances de la majorité des systèmes physiologiques telles que la locomotion, la croissance, la digestion et la reproduction (Brett, 1971 ; Fry, 1971 ; Dawson, 1975 ; Huey and Stevenson, 1979, Huey, 1982). Les conséquences écologiques, physiologiques et comportementales de cette sensibilité thermique sont importantes (Park, 1954 ; Christian and Tracy, 1991 ; Hertz *et al.*, 1982 ; Huey, 1982). D'autre part, la température ambiante est un facteur environnemental clé qui influence une variété d'aspects de l'écologie et du développement. Les insectes sont particulièrement vulnérables aux changements climatiques à cause de leur petite taille et les fonctions physiologiques de base sont fortement influencées par la température environnementale (Deutsch *et al.*, 2008).

Peu d'études se sont intéressées à l'influence des températures extrêmes qui peuvent apparaître dans la nature, par exemple les températures minimales et maximales en été ou en hiver. Au niveau des individus, ces variations journalières ou hebdomadaires peuvent être perçues comme un stress thermique. Comparés aux conséquences létales, les effets non létaux des stress thermiques ont reçu peu d'attention. Chez les insectes, le succès reproducteur et la survie sont affectés par les stress thermiques. La reproduction est plus sensible aux stress thermiques que d'autres traits d'histoire de vie. De plus, les mécanismes de la reproduction sont souvent altérés plus précocement et dans des conditions moins sévères que celles qui affectent la survie (Fasolo et Krebs, 2004).

Si les effets des stress thermiques sur la femelle sont bien connus, ceux apparaissant chez les mâles sont moins clairs. Il est montré cependant, que les changements de température altèrent plus les fonctions reproductives des mâles que des femelles (Giojalas et Catala, 1993 ; David *et al.*, 2005). Quelques études se sont intéressées aux deux sexes à la fois (Mironidis *et al.*, 2010) sans pouvoir dire quel sexe était majoritairement affecté. D'autres ont testé les effets des stress sur les mâles à travers leur capacité à fertiliser les femelles (Jørgensen *et al.*, 2006) ; cependant, dans peu d'études, le stock de spermatozoïdes était utilisé comme paramètre représentant les capacités reproductives des mâles (Snook *et al.*, 2000 ; Lacoume *et al.*, 2007, 2009).

Chez les hyménoptères, la quantification du stock de spermatozoïdes trouvée dans les vésicules séminales des mâles et dans la spermathèque des femelles après copulation, est d'une importance majeure à cause du mode de reproduction chez ces insectes (parthénogénèse arrhénothoque). Comme les mâles sont produits à partir d'ovocytes (haploïdes) et les femelles d'œufs diploïdes, ce paramètre est un régulateur clé de la sex-ratio. Ceci a été montré chez différents hyménoptères parasitoïdes (pour revue : Nguyen *et al.*, 2013). Après différents types de stress comme un stress nutritionnel (Lacoume *et al.*, 2006), thermique (Lacoume *et al.*, 2009) ou chimique (Lacoume *et al.*, 2009), les mâles deviennent sub-fertiles. Cette réduction de la fertilité, appelée sub-fertilité ou hypofertilité est très différente de la stérilité résultant d'un stress dans beaucoup d'organismes (David *et al.*, 2005).

Le stade de vie est un facteur important dans la tolérance des insectes aux variations de température ; toutefois cela varie selon les espèces (Abdelghany *et al.*, 2010). D'autre part, lorsqu'on effectue en laboratoire un stress thermique, celui-ci doit être appliqué à un stade critique de la spermatogénèse pour affecter la fertilité des mâles. Chez la plupart des insectes, la spermatogénèse commence à un stade précoce du développement (larve). Elle est maximale chez la nymphe quand les spermatozoïdes deviennent matures et qu'ils ne sont pas encore stockés dans les vésicules séminales (Chihrane et Laugé, 1994).

Dans cette partie, à partir de différents protocoles expérimentaux, en laboratoire, nous analyserons les conséquences de stress thermiques (froids et chauds) sur la fertilité des mâles d'*Anisopteromalus calandrae*. En conditions contrôlées, les différents traitements thermiques seront appliqués aux mâles, au stade nymphe et pour les stress chauds également au stade adulte ; la fitness des mâles sera étudiée à travers le succès de développement, la survie et le stock de spermatozoïdes. Les effets sur les femelles accouplées avec des mâles stressés et les conséquences sur la sex-ratio de la descendance seront également étudiés. Enfin, pour les deux catégories de stress thermiques, nous analyserons s'il existe des températures qui induisent des mâles sub-fertiles ou stériles. Dans le cas de mâles stériles, nous vérifierons si cette stérilité est temporaire ou permanente.

Chapitre 1
Effets des basses températures appliquées au stade larvaire sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae*

Introduction

La température est un facteur limitant important des activités biologiques chez les insectes. Les réponses de l'organisme aux températures basses sont beaucoup plus variables que celles aux températures hautes (Denlinger and Lee, 1998).

Les premiers paramètres affectés par de basses températures sont le développement et l'émergence (Lacoume, 2007). La température a un effet indéniable sur le développement des insectes. Selon une échelle thermo-biologique d'un insecte, d'après Vannier (1994) et Uvarov (1931), les insectes ont un développement normal dans la zone d'activité supra-optimale, là où se trouve l'optimum thermique (Figure 2). Lorsque la température environnementale diminue, l'organisme entre en premier lieu dans la zone d'activité infra-optimale durant laquelle ses fonctions essentielles sont progressivement ralenties. L'activité est fortement ralentie jusqu'à son arrêt total si la température continue à diminuer jusqu'à la zone de torpeur temporaire ou plus.

Les insectes ne peuvent pas se développer en dessous d'un seuil minimum de température qui varie suivant les espèces ou pour une même espèce selon le stade de développement. Par exemple, à moins de 15 °C *Quadrastichus haitiensis* - un parasitoïde des *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera : Curculionidae) - ne se développe pas (Castillo *et al.*, 2006). Chez *Aprostocetus vaquitarum* - un parasitoïde d'œuf de *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coléoptère : Curculionidé), à 15 °C, il peut se développer du stade d'œuf au stade larvaire mais n'atteint pas le stade de pupe (Ulmer *et al.*, 2006). Quand la température est favorable, pour terminer leur cycle de développement, les insectes doivent aussi bénéficier d'une bonne durée d'éclairement (Stacey and Fellowes, 2002), qui est en relation avec la consommation de l'énergie nécessaire pour un bon développement. Cela explique que la durée de développement est lente à basse température et accélérée lors de son augmentation (Jarošík et Honěk, 2007). Néanmoins, la vitesse de développement augmente jusqu'à l'atteinte d'une température optimale et après elle diminue (Jarošík et Honěk, 2007).

La vitesse de développement des insectes est donc en relation avec la température du milieu extérieur. La majorité des insectes a une capacité de résistance limitée à des températures basses, inférieures à 0 °C (Lee et Denlinger, 1991). Cependant une brève exposition au froid peut provoquer des dommages importants sur le succès de développement

des insectes. Après une heure de choc froid (-18 °C) appliqué au stade nymphal chez les mâles *Dinarmus basalis*, la mortalité au cours du développement est plus élevée et ils ont beaucoup de difficultés pour émerger par rapport aux mâles non choqués. Environ 13 % des mâles meurent avant d'émerger et 15 % des adultes présentent des altérations morphologiques visibles, liées à l'abandon de leur exuvie (Lacoume, 2007). De plus, les dommages causés par le froid peuvent aussi altérer les membranes plasmiques, l'activité de certaines enzymes, les fonctions organiques. En conséquence, elles pourraient empêcher l'émergence des adultes.

Il a été montré que les basses températures ont aussi de nombreux effets négatifs sur la reproduction des insectes. Par exemple, chez *Rhyzopertha dominica*, la capacité de reproduction est complètement diminuée quand les insectes sont exposés à des températures inférieures à 17 °C (Baldassari *et al.*, 2005). Ainsi chez *Palodia interpunctelle* (Hubner) (Lepidoptera), le nombre d'œufs pondus par femelle diminue après une longue exposition à 10 °C (Johnson *et al.*, 1997). De plus, un stress thermique à basse température peut causer des dommages importants sur la reproduction des insectes mâles. Cela peut provoquer une stérilité des mâles due à la formation de testicules anormaux ou à des anomalies cellulaires apparaissant durant la spermatogenèse : la réduction de la prolifération des cellules gamétiques, la production de spermatides anormales, ou encore l'absence de spermatozoïdes mobiles (Lacoume, 2007). Tous ces dégâts affectent la production des spermatozoïdes. Par exemple, chez *Dinarmus basalis*, après un bref choc froid à -18 °C, la quantité de spermatozoïdes contenus dans les vésicules séminales des mâles choqués est toujours plus faible que celle des mâles témoins (Lacoume *et al.*, 2007). Cela pourrait provenir d'un blocage de la différenciation des spermatozoïdes au cours de la spermatogenèse (Cohet, 1973).

Dans ce travail, nous utiliserons *Anisopteromalus calandrae* (Howard). Il appartient à la famille des Pteromalidae de la superfamille Chalcidoïdea. C'est un ectoparasitoïde idiobionte solitaire généraliste qui s'attaque aux larves et nymphes de la plupart des espèces de Coléoptères ravageurs de graines (Lebreton, 2009). *A. calandrae* est une espèce cosmopolite originaire d'Afrique et du Sud Est asiatique, et est utilisé comme agent de lutte biologique à travers le monde (Ahmed *et al.*, 2006). La souche utilisée au laboratoire a été rapportée de Côte d'Ivoire en 2000. Bien entendu, c'est une espèce tropicale. Dans cette étude, nous cherchons à savoir quels sont les effets de basses températures sur le développement et la reproduction des mâles d*'A. calandrae*.

Matériel et méthodes

Le système de graines artificielles

Ce système est confectionné pour mimer les graines de niébé parasitées par le bruche *Callosobruchus maculatus* (Gauthier et Monge, 1999; Darrouzet *et al.* 2003). Il se compose de deux parties : le patch de ponte et la plaque de développement.

Le patch de ponte est composé d'une dizaine de gélules en gélatine transparente fixées en cercle à l'aide de « Patafix ». La gélule, dont le corps est enfoncé à l'aide d'un piston de manière à accueillir une larve de bruche *C. maculatus* et recouverte du capuchon comme une graine artificielle. 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 (Lebreton, 2009). Ces trous permettent également au parasitoïde d'introduire plus facilement son ovipositeur dans la gélule afin de pondre.

La plaque de développement est une plaque en Plexiglas d'1cm d'épaisseur, percée de 8x5 trous imitant la loge nymphale des bruches et un couvercle transparent en Plexiglas pour faciliter l'observation du développement des parasitoïdes sans interférence et recueillir les nymphes qui seront soumises à un stress thermique à long terme.

Obtention des femelles vierges

Pour rappel, les hyménoptères parasitoïdes se reproduisent par parthénogenèse arrhénotoque, les œufs non fécondés donnent des mâles, tandis que les œufs fécondés donnent des femelles. Dans ce travail, pour obtenir des mâles, nous ne prenons que des femelles vierges que nous mettons en ponte.

Nous tamisons des boîtes de graines en début de matinée afin d'enlever tous les individus qui ont émergé au cours des heures précédentes car ils ont pu s'accoupler. Par la suite, nous isolons immédiatement les femelles qui émergent des graines. Ensuite, nous laissons les femelles dans des boites de Pétri (10 femelles par boite) puis dans une chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %) pendant 24h avant de les laisser pondre. Nous fournissons comme nourriture un coton imbibé d'eau sucrée (20 % de saccharose) pour chaque boîte.

Mise en ponte

Les femelles sont mises en ponte dans un patch (10 femelles par patch) contenant 7 gélules collées en cercle au fond du patch à l'aide de « Patafix » avec un coton imbibé d'eau sucrée. Chaque gélule contient une larve de bruche de 18 jours au stade larvaire L4. Tous les patchs de ponte sont mis dans une chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % - 70 %). Les patchs de ponte sont changés toutes les 24 heures.

Développement des mâles après un stress thermique de longue durée

Après 24h de ponte, nous retirons les œufs pondus à l'aide d'une pince. Chaque œuf est mis sur une larve de bruche de 18 jours (stade larvaire L4), ensuite mis dans une alvéole de la plaque de développement (Figure 19 19). Toutes les plaques sont mises dans la chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %).

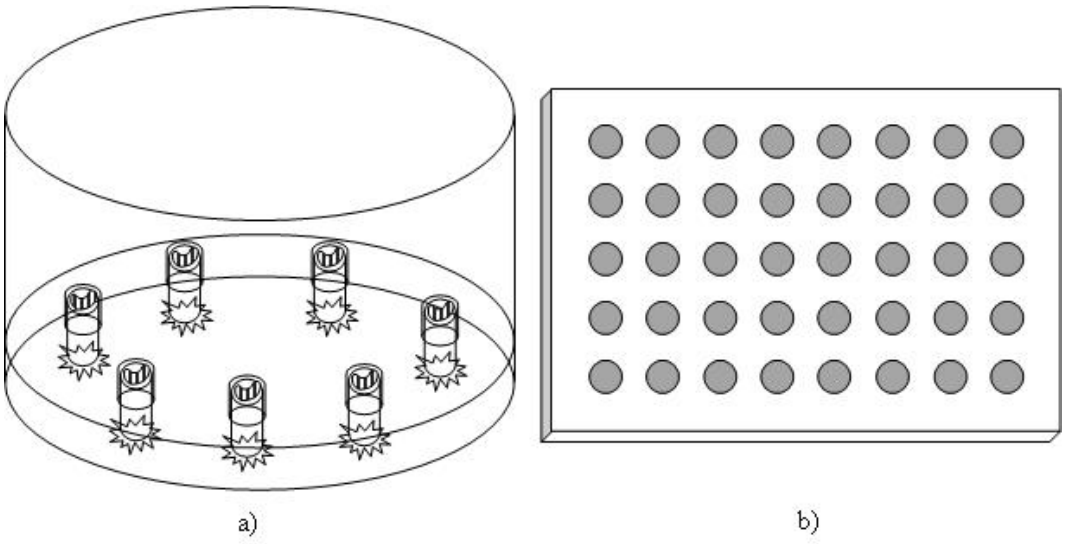


Figure 19 - (a) Patch de ponte contenant des gélules renfermant chacune une larve hôte et (b) système artificiel de développement

Quand les larves de parasitoïdes se transforment en nymphes, à ce moment là elles sont toutes blanches (7 - 8 jours). Ce stade corespond aux « nymphes blanches ». Nous prenons donc les « nymphes blanches » et les divisons en deux groupes. Le premier groupe est soumis à différents stress de températures : 5°C (n = 30) ; 10°C (n = 30) ; 15 °C (n = 25) pendant 3 jours. Ensuite, les « nymphes blanches » sont remises dans la chambre climatisée (33 °C : 23 °C, L12h : D12h, Rh 50 % : 70 %) jusqu'à l'émergence des mâles traités. Le

deuxième groupe (n = 36) continue à se développer dans la chambre climatisée (J : N 12h - 12h, 30 °C, RH 65-70 %) jusqu'à l'émergence des mâles témoins (Figure 20).

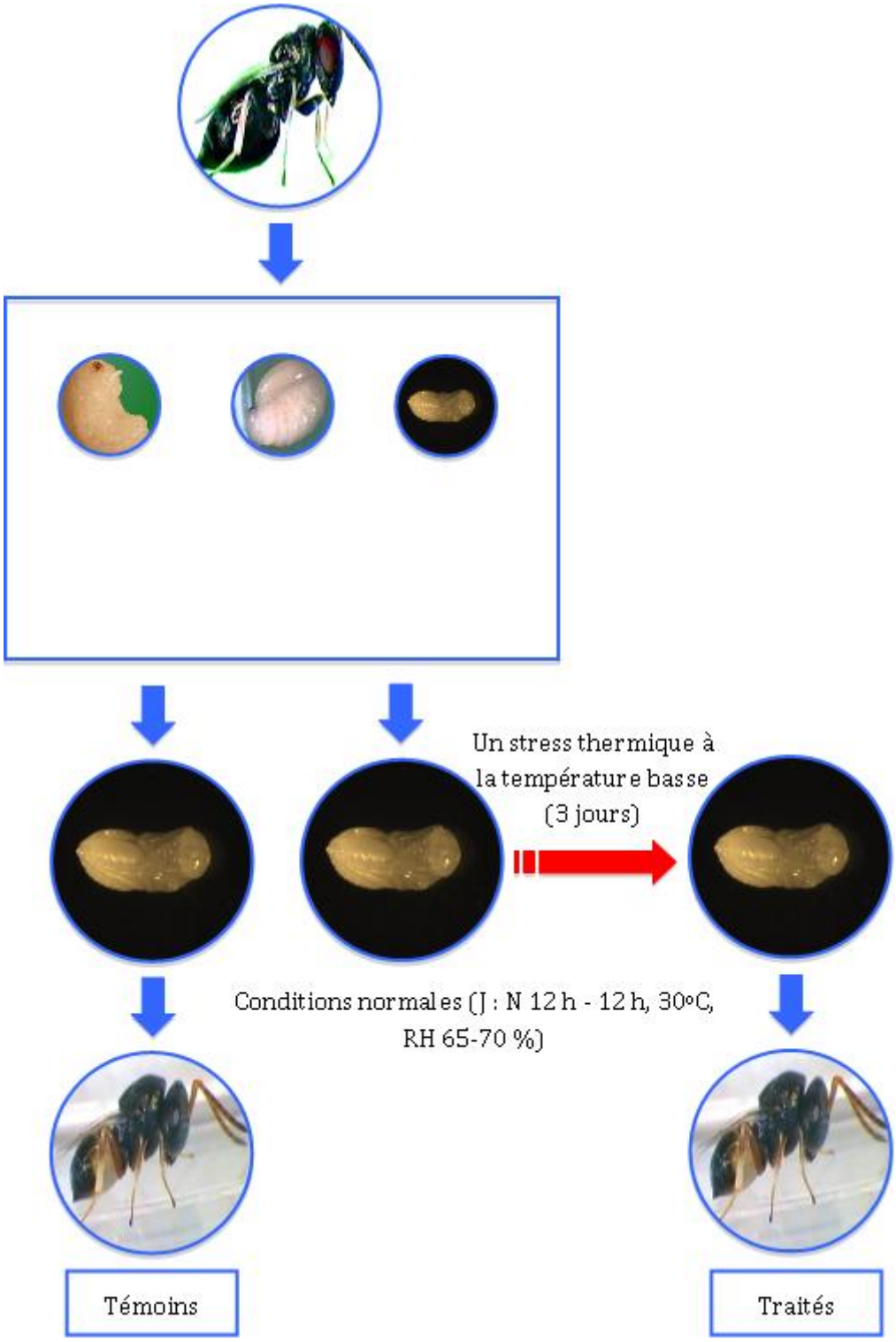


Figure 20 - Développement des mâles sans et après un stress thermique de longue durée

Paramètres mesurés

Durée de développement des mâles

Grâce au système de plaque de Plexiglas, la durée précise du développement ainsi que la mortalité des nymphes ont pu être mesurées. La durée de développement est comptée à partir du stade « nymphe blanche » jusqu'à l'émergence. Nous déterminons de cette manière le pourcentage de mâles traités et témoins qui émergent.

Taille des mâles

Dans cette partie, la taille des mâles est représentée aussi par la largeur de la tête comme décrit au chapitre précédent.

Nombre de spermatozoïdes

Les mâles sont disséqués tout de suite après l'émergence. Chaque mâle est disséqué dans une goutte de Beadle (128,3 mM NaCl ; 4,7 mM KCl ; 2,3 mM CaCl2). Nous extrayons et nous transférons chaque vésicule séminale du mâle dans une goutte de Beadle. La vésicule séminale est dilacérée pour faire sortir les spermatozoïdes. Ensuite, les spermatozoïdes sont étalés à l'aide de pinces à dissection. Après une fixation à l'éthanol 100 % et une coloration au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), le nombre de spermatozoïdes stockés dans la vésicule séminale est déterminé sous le microscope à épi fluorescent et au grossissement x 200 (Bressac et Chevrier, 1998).

Analyses statistiques des données

Le logiciel R est utilisé pour les traitements statistiques. La signification retenue est toujours $p < 0,05$. La normalité des résultats a été vérifiée pas le test Shapiro-Wilk.

Le t-test Student est utilisé pour la comparaison entre deux nombres moyens de données quantitatives (la durée de vie, la taille et le nombre de descendants), remplacé par le test Wilcoxon si les données ne suivent pas une loi normale. Un test ANOVA est utilisé pour comparer l'ensemble des données. Pour la comparaison entre les proportions indépendantes, on a utilisé le test du Chi^2.

Résultats

Durée de développement et pourcentage de mâles qui émergent

Ca depend de la température de stress appliquée sur les nymphes blanches (à 5 °C, 10 °C et 15 °C), la durée de développement est significativement différente (ANOVA : $df = 2$; $F = 28{,}082$; $p < 0{,}001$, Figure 21). Elle est en moyenne de 12,55 jours à 5 °C ; 12,03 jours à 10 °C et 11,75 jours à 15 °C. De plus, la durée de développement des mâles traités est significativement différente par rapport aux témoins (9,27 jours) (ANOVA : $df = 3$; $F = 614{,}74$; $p < 0{,}001$, Figure 21).

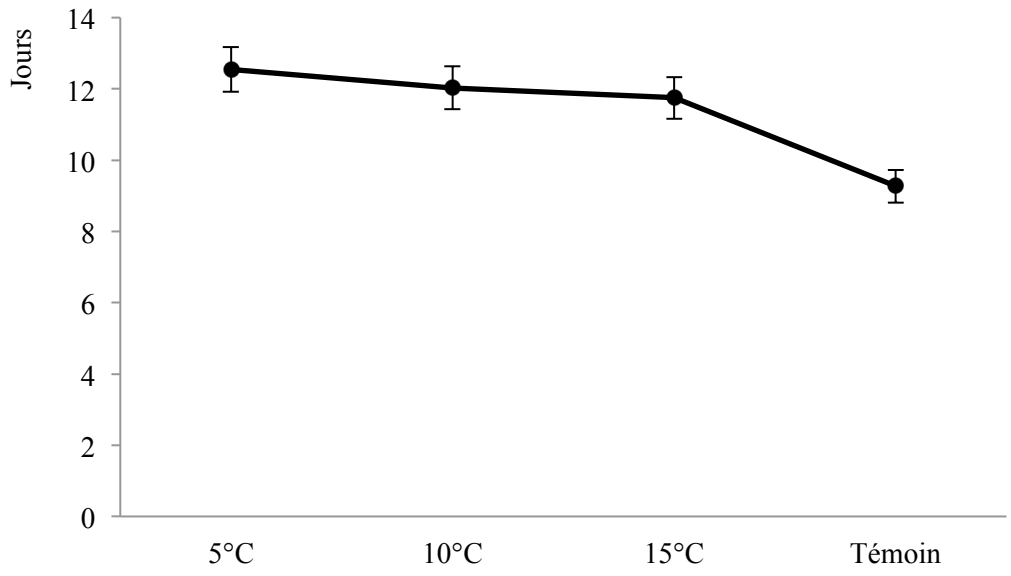


Figure 21 - Durée de développement des mâles en fonction de la température appliquée sur la nymphe blanche durant 3 jours

Quelque soit la température, le pourcentage des mâles qui émergent après un stress thermique est supérieur à 90 % (Figure 22). Il n'y a pas de différence significative entre témoins et traités (Chi^2 : $df = 3$, $F = 1{,}32$; $p > 0{,}05$).

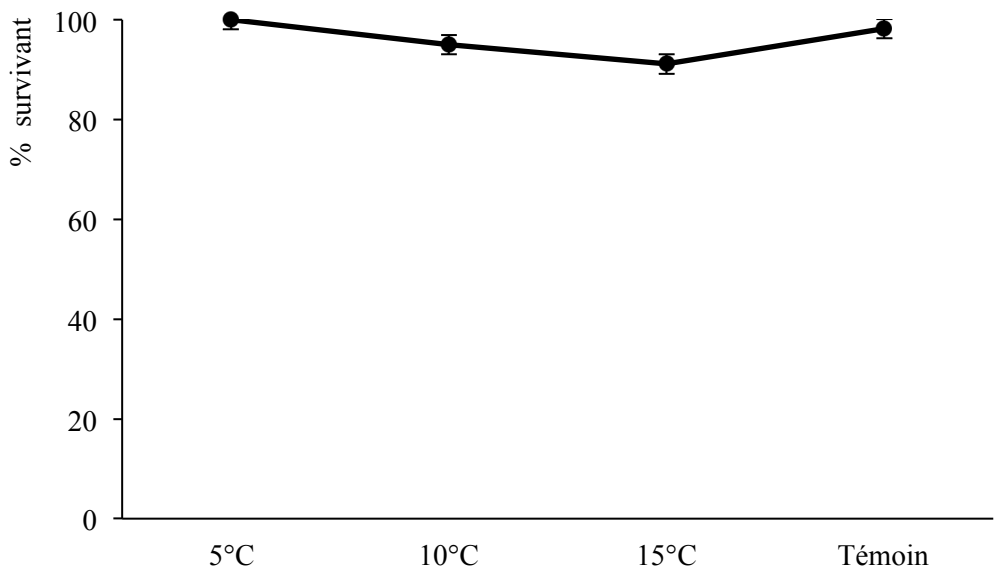


Figure 22 - Pourcentage d'émergence des mâles après un stress thermique appliqué sur la nymphe blanche durant 3 jours

La morphologie

A l'émergence, la taille des mâles traités et témoins est similaire (ANOVA, $df = 3$, $F = 0{,}1749$; $p > 0{,}05$). La largeur moyenne de la tête des mâles pour les deux catégories est 0,78 mm (Figure 23).

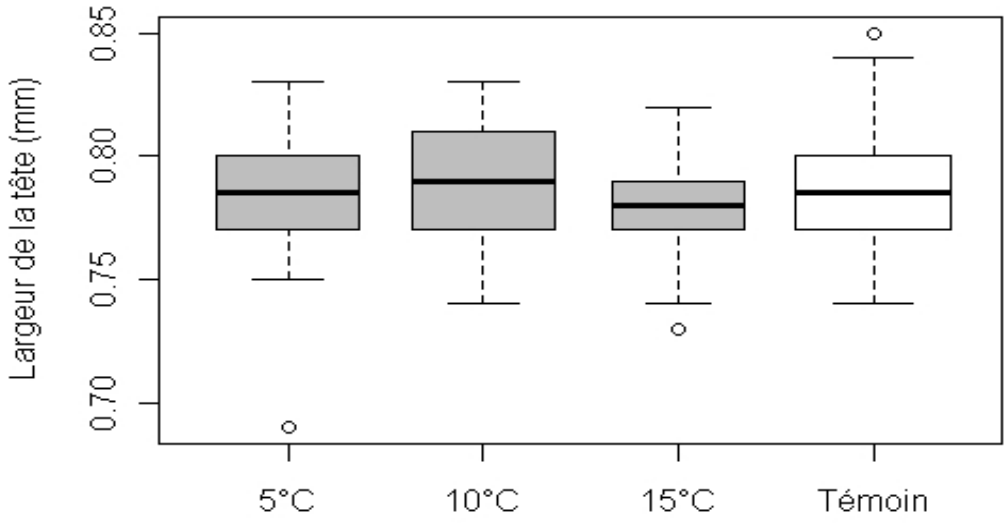


Figure 23 - Effet de la température sur la taille des mâles à l'émergence

Nombre de spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales des mâles 1 jour après émergence

Un stress thermique à basse température appliqué au stade nymphal durant 3 jours ne réduit pas significativement le nombre de spermatozoïdes stocké dans les vésicules séminales des mâles traités par rapport aux témoins (ANOVA : $df = 3$; $F = 2{,}5539$; $p > 0{,}05$). Quelque soit la température, il y a en moyenne 2500 spermatozoïdes (Figure 24).

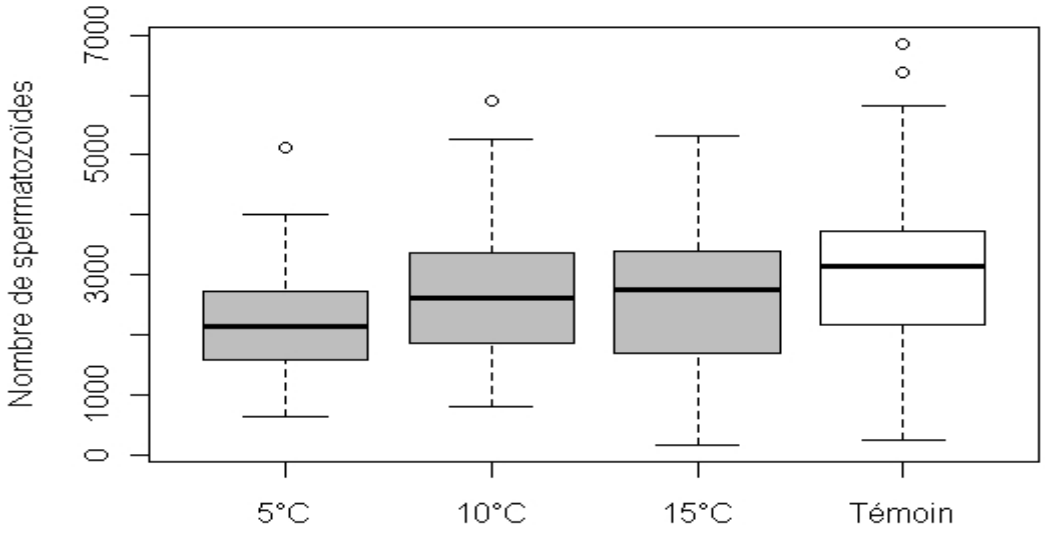


Figure 24 - Nombre de spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales des mâles traités et témoins 1 jour après l'émergence

Discussion

Les insectes sont des poïkilothermes : leur température corporelle varie avec celle de l'environnement qui est un des facteurs déterminants de la dynamique de leur population. Tout au long de la vie d'un insecte, la température externe joue un rôle primordial dans plusieurs phases de son cycle biologique : le développement (durée de développement), la croissance, la production (nombre de générations par an selon la température), la survie (seuil de froid pour la mortalité hivernale, seuil de température minimale pour l'essaimage) et la distribution de l'insecte (James *et al.*, 2002). Selon la gravité du stress subi, les individus émergent plus ou moins facilement (Lacoume, 2007). Dans cette partie de notre étude, un

stress froid (5, 10 et 15 °C) appliqué pendant 3 jours au stade nymphal chez *Anisopteromalus calandrae*, n'affecte pas tous les paramètres du développement de la même manière.

La mortalité n'est pas augmentée par un stress thermique de longue durée au stade nymphal. Cela peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, notre espèce est d'origine tropicale (la souche utilisée au laboratoire a été rapportée de Côte d'Ivoire et entretenue au laboratoire depuis 2000 (33 °C: 23 °C, L12h : D12h, rh 50 % : 70 %)) mais elle peut résister au froid. Il a été montré que des traitements froids (-10 °C pendant 2h) pour tuer le parasite du riz *Sitophalus oryzae* (L) avant d'éclore, n'altérait pas le développement de son parasitoïde (*A. calandrae*). Le développement de *A. calandrae* s'effectuait normalement et 100% des individus émergeaient ((Burks *et al.*, 1999). Lorsqu'un insecte est exposé à des températures proches de sa limite léthale, l'animal peut s'adapter et survivre à des températures qu'il n'aurait pas pu supporter auparavant. En outre, le stade expérimenté au cours de notre étude est le stade nymphal ; bien qu'il soit un stade de transformation, il est aussi un stade de résistance chez la plupart des insectes (Lacoume, 2007).

La taille des individus également n'est pas affectée par le stress thermique aux basses températures. Dans cette étude, chaque œuf est mis sur une larve de bruche de 18 jours au stade larvaire L4 jusqu'à ce que les larves de parasitoïdes se transforment en nymphes. C'est-à-dire, au moment d'être exposée aux basses températures, la tête doit être formée. Malgré 3 jours d'exposition aux basses températures, la taille de la tête n'est pas affectée.

Dans des conditions différentes, la durée de développement chez *A. calandrae* peut varier, lorsque la température est basse, la durée de développement augmente. Dans notre étude, les nymphes blanches subissent des températures entre 5, 10 et 15 °C durant 3 jours, la durée de développement augmente en moyenne de 3 jours par rapport aux témoins. Les basses températures ralentissent donc le développement. Ce résultat est en accord avec les résultats précédant sur la même espèce (Islam, 1993 ; Do Thi Khanh, 2005). La durée de développement est entre 10 et 11 jours à 30 °C (Islam, 1993). Mais elle est entre 14 et 16 jours à 23 °C (Do Thi Khanh, 2005). Nous avons constaté qu'un stress thermique de longue durée à des températures basses mais pas trop drastiques peut altérer la durée de développement. Par contre, un choc thermique durant un temps court à la température extrême (-18 °C, pendant 1h) n'affecte pas la durée de développement car le choc est trop bref pour ralentir le développement (Lacoume *et al.*, 2007)

Dans notre étude, les insectes ont subi un stress thermique qui est long mais la condition est peu drastique. Il est différent avec un choc thermique qui est bref mais avec une condition extrême. Nos résultats montrent que la quantité de spermatozoïdes contenus dans les vésicules séminales chez les mâles stressés et chez les mâles témoins n'est pas différente. En général, un stress thermique n'altère pas l'anatomie du tractus génital (David *et al.*, 1971) donc, même si le stress thermique a été réalisé au moment où l'appareil génital commençait à se mettre en place, cela n'a pas empêché la spermatogénèse de se faire normalement. Dans les études précédentes, il avait montré qu'un choc thermique provoquait un retard dans la mise en place de la spermatogénèse (Lacoume *et al.*, 2007) et même à l'émergence une proportion de mâles était stérile. Dans l'étude que nous avons menée, il est fort probable que la température de stress n'était pas suffisamment basse pour affecter la production des spermatozoïdes.

En conclusion, un stress thermique à basse température appliqué durant 3 jours au stade «nymphe blanche» augmente significativement la durée de développement des mâles mais n'augmente pas la mortalité durant le développement. La taille des mâles à l'émergence et leur capacité de reproduction ne sont pas affectées.

Chapitre 2
Effets des hautes températures appliquées au stade larvaire sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae*

Article 1

Heat stress affects male reproduction in a parasitoid wasp

Thanh Manh Nguyen, Christophe Bressac, Claude Chevrier

Journal of Insect Physiology 59 (2013) 248-254

Abstract

In insects, reproductive success and survival are affected by temperature. Reproduction is more sensitive than other physiological traits. While the effects of heat stress on females are well known, the effects on males are less clear. Hymenopteran parasitoids are valuable for studying the consequences of heat stress on male reproduction. In these species, through arrhenotoquous parthenogenesis, the sex ratio of the offspring is directly dependent on the sperm stock acquired by females during copulation. In the lab, heat temperature treatments (32 to 44°C) were applied for 3 days in the nymphal stage of *Anisopteromalus calandrae* males, and development was completed at 30°C. Three different effects were observed depending on the temperature: mortality above 42°C, sterility of emerging males at 40°C, and sub-fertility at 38°C. This sub-fertility is characterized by a dramatic decrease in male sperm supplies, of up to 7% compared to control males. In the course of ageing, the sperm stock of sub-fertile males increases but never reaches the level of control males. Survival was significantly higher in control (30°C) males than those treated at 38°C. Male mating ability was similar whatever the treatment (control and 38°C), but females mated with 38°C-treated males stored 100 times less sperm on average than those mated with control males. The offspring sex ratio of females mated with 38°C-treated males was strongly male biased. The physiological mechanisms are as yet unknown. The relationship between temperature, sperm stock and sex ratio should be taken into account in the management of parasitoids for integrated pest management.

Keywords: *Anisopteromalus calandrae*; nymphal stage; male fitness; sub-fertility; sperm stock; spermatogenesis.

Introduction

Ambient temperature is a key environmental factor influencing a variety of aspects of insect ecology and development. Insects are particularly vulnerable to climate change because their small size and basic physiological functions are strongly influenced by environmental temperature (Deutsch *et al.*, 2008). Damage as a result of high temperature has been studied in particular (Denlinger and Yocum, 1998). Temperatures that are too high can be a daily threat to survival (Rinehart *et al.*, 2000). Mortality can occur immediately, as documented for several insects of economic importance (Armstrong, 1992; Hansen, 1992), or result in a failure to complete development, as shown in *Sarcophaga crassipalpis* (Denlinger *et al.*, 1991) and *Drosophila melanogaster* (Mitchell and Lipps, 1978).

Most studies on temperature-dependent performance have focused on the "zone of effective temperature" (Girish, 1965), the temperature at which insects are active. However, few studies have investigated the influence of extreme temperatures occurring under natural conditions, for example the minimum and maximum effective temperature in summer or warm season. At the individual level, daily or weekly variations of temperature can be perceived as heat stress.

Compared to lethal consequences, the non-lethal effects of heat stress have received little attention. These are often measured as impairments in locomotor performance, survival rate in the course of ageing, or metabolic rate (Denlinger and Yocum, 1998; Roberts *et al.*, 2003; Cano and Nicieza, 2006; Dahlhoff *et al.*, 2008). Several works have shown that insects surviving exposure to sub-lethal high temperature may exhibit impairments in development, eclosion rhythm, morphology, longevity, fecundity, fertility, and overall fitness (Proverbs and Newton, 1962; Gonen, 1977; Arbogast, 1981; Saxena *et al.*, 1992; Yocum *et al.*, 1994; Rinehart *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003; Mahroof *et al.*, 2005; Jørgensen *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2008; Niedermayer *et al.*, 2012). However, reproductive traits are thought to be more sensitive to thermal stress than other traits and should therefore be included when estimating the fitness effects of thermal stress (Jørgensen *et al.*, 2006). Moreover, reproductive processes are often affected by temperature change earlier, in other words by less severe conditions than those affecting survival (Fasolo and Krebs, 2004). Several studies have investigated the negative effects of heat shock on reproduction in both males and females of different insect species (Rinehart *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007; Cui *et*

al., 2008; Mironidis and Savopoulou-Soultani, 2010; Roux *et al.*, 2010; Zizzari and Ellers, 2011; Niedermayer *et al.*, 2012). It has been reported that heat shock can cause injury to oocytes and ovarian development in females which could lead to a decrease in egg production (Mironidis *et al.*, 2009). Furthermore, heat shock can reduce male fertility due to direct damage to the testes and sperm (Chirhane and Laugé, 1994, 1997; Krebs and Loeschcke, 1994, Scott *et al.*, 1997; Rinehart *et al.*, 2000; Rohmer *et al.*, 2004).

Temperature change usually affects male more than female reproductive functions (Giojalas and Catala, 1993, David *et al.*, 2005), although this has not been observed in some species (Janowitz and Fischer, 2011). Some studies have focused on both sexes, making it difficult to attribute effects to one or other sex (Mironidis *et al.*, 2009); others have tested the effects on males through their capacity to fertilize females (Jørgensen *et al.*, 2006). In a few studies, sperm stocks were measured as the male reproductive capacity (Snook *et al.*, 2000; Lacoume *et al.*, 2007, 2009). In male *Drosophila*, the most widely studied model, heat stress often causes sterility or reduced fertility (Zizzari and Ellers, 2011). The male fertilizing capacity of *Drosophila buzzatii* is temperature-dependent, and heat stress in male adult results in decreased female output (mated with stressed males, Jørgensen *et al.*, 2006). Unusually, *Drosophila simulans* males infected with *Wolbachia* produce more sperm after heat stress (Snook *et al.*, 2000).

In hymenoptera, sperm stocks in both males and females (after copulation) are of major importance because of arrhenotoquous parthenogenesis. As males are produced from haploid oocytes and only female offspring emerge from diploid eggs, sperm stock is a key regulator of sex ratio. This has been shown for example in the pteromalid parasitoid *Dinarmus basalis* (Bressac and Chevrier, 1998). Males of *D. basalis* have low sperm stock at emergence after poor nutrition (Lacoume *et al.*, 2006) and cold shocks (Lacoume *et al.*, 2007). *Anisopteromalus calandrae* (Pteromalidae) males are also sub-fertile after consuming a pesticide (Lacoume *et al.*, 2009). In stressed males, the sperm stock in freshly emerged individuals can be less than half that of unstressed males. However, due to continuous spermatogenesis, after a few days, the level of sperm stock of stressed males reaches that of unstressed young virgin males. But in any case, at the same age, the sperm count of stressed males never exceeds that of unstressed males. In these species, and after stresses tested, reduced sperm has no consequences on one male-one female mating, males obtaining

standard offspring and sex ratios (Do Thi Khanh *et al.*, 2005; Lacoume *et al.*, 2009; Bressac *et al.*, 2008).

This reduced fertility, called sub-fertility or hypo-fertility, is very different from sterility resulting from stress in many organisms (David *et al.*, 2005).

Life stage is an important factor in an insect's temperature tolerance but varies in different species (Abdelghany *et al.*, 2010). The experimental temperature stress must also occur at a critical phase of spermatogenesis to affect male fertility. In most insects, spermatogenesis starts at an early stage (larvae) and is maximum in nymphs when spermatozoa begin to mature and are not yet stored in seminal vesicles (vas deferens) (Chirhane and Laugé, 1994).

Anisopteromalus calandrae Howard (Hymenoptera: Pteromalidae) is a common and cosmopolitan parasitoid (solitary ectoparasitoid, idiobont) of grain weevils in many tropical and sub-tropical countries (Islam and Nargis, 1994) where temperatures can be very high (Niedermayer *et al.*, 2012). This wasp is used as a biological control agent against pests in seed stocks (for review see Lacoume *et al.*, 2009), and rearing conditions in laboratory have been documented (Van den Assem *et al.*, 1984; Smith, 1992, 1993; Choi *et al.,* 2001). *A. calandrae* is a good model for studying how high temperature treatments during development affect male reproduction. Male reproductive value (mating capacity, male sperm reserve, sperm stored in spermatheca, outcome of sperm competition, offspring obtained after one mating) has been studied under standard laboratory conditions (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). The initial sperm stock determines male fitness, because the number of female offspring (only females are produced from fertilized eggs in arrhenotokous parthenogenesis) resulting from mating is influenced by the number of sperm transferred by males. Sperm stocks in both males and females are low (several hundred), and the fertilizing efficiency of stored sperm is high [0.75, representing the probability of fertilization of a spermatozoa stored in the female spermatheca (Do Thi Khanh *et al.*, 2005)]. The developmental stage in which testis formation and spermatogenesis are greatest but not completed is the early nymphal stage (white nymph with uncolored eyes, unpublished data), which is thus a critical stage for the future reproductive potential of the male (Chirhane and Laugé, 1994 in *Trichogramma brassicae*). In *A. calandrae*, spermatogenesis continues in adult males, and old virgin males have about 1.75 times more spermatozoa than young virgin males (Bressac *et*

al., 2009). In this species, temperature has an impact on the success of reproduction (Niedermayer *et al.*, 2012).

The present paper describes an experiment to investigate the consequences of heat stress on male fertility in a parasitoid wasp. Under controlled conditions, heat treatments were applied to *A. calandrae* males at the nymphal stage. Male fitness was studied through developmental success, survival and sperm stock. The effects on females mated with these heat-stressed males and their offspring sex ratio were also studied. We also investigated whether heat temperature treatment induced permanent or temporary male sub-fertility or sterility.

Materials and Methods

The *Anisopteromalus calandrae* Howard (Hymenoptera; Pteromalidae) strain collected from cowpea stocks in Ivory Coast (Africa) has been reared in the laboratory since 2000 (Do thi Khanh *et al.*, 2005; Lacoume *et al.*, 2007) on larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) which develop in cowpea seeds (*Vigna unguiculata*). Mass rearing was carried out in a climatic room (light: dark periods 12 h: 12 h, temperature 30°C, relative humidity 65-70 %). In *Anisopteromalus calandrae*, unfertilized, haploid eggs develop as males through arrhenotoquous parthenogenesis. To obtain males only, virgin *A. calandrae* females were offered *C. maculatus* last instar larvae placed in a translucent gelatin capsule (Damiens *et al.*, 2001). As *A. calandrae* is an ectoparasitoid, eggs can be collected as soon as laid. Freshly laid eggs were collected and each egg was gently deposited on a *C. maculatus* fresh last instars larva. The parasitoids developed in individual wells of a plexiglas plate covered with a translucent plate. The whole system was placed in a climatic chamber (light - dark periods 12 h: 12 h, temperature 30 C, RH 65-70 %). This artificial system allows male larval development to be observed without interference and the nymphs to be collected at a given stage.

High temperature treatments

The high temperature treatments were applied to nymphs with uncolored eyes at an early stage (approximately seven days after egg laying under lab conditions). At this stage, testes are present, but seminal vesicles are not formed and mature spermatozoa are still not

produced (unpublished in *A. calandrae*). Similar observations have been made for the timing of testicular development and sperm maturation in the Pteromalids *Nasonia vitripennis* (Hogge and King, 1975) and in *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) (Lacoume *et al.*, 2007).

Two groups were created. (1) Heat-stressed: male nymphs were heat-treated for three days at six temperatures (32, 36, 38, 40, 42 and 44°C). For each temperature, a Plexiglas plate with the nymphs was transferred to a climate-controlled incubator for three days. Humidity was constant (65 -70%). After 3 days, the plates were returned to the climatic chamber at 30°C until development was complete. (2) Controls: nymphs were maintained continuously in the climatic chamber until emergence.

Stored sperm in virgin males were counted the day of emergence in each treatment group. Because a similar quantity of sperm is contained in the two seminal vesicles (unpublished data), only one vesicle was dissected and the sperm dispersed in a drop of saline solution (128.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.3 mM $CaCl_2$). Sperm were exhaustively counted under a fluorescence microscope after ethanol fixation and DAPI staining (Bressac and Chevrier, 1998). The number was multiplied by two to obtain the total male sperm reserve.

In females, the spermatheca was isolated 2h after the end of mating and opened in a drop of saline. All sperm were counted after DAPI staining as in males.

After temperature treatment, mortality during development was calculated as the proportion of individuals that failed to develop out of the total in each experimental group: control (n=228), temperature of 32°C (n = 228), 36°C (n=219), 38°C (n=148), 40°C (n=198), 42°C (n=63) and 44°C (n=57). Lethal (50% fail to develop) and sub-lethal (25%) temperatures were determined.

In order to detect any effect of heat stress on the size of males, head width was measured for each group (control (n=36), temperature treatment at 36°C (n=30), 38°C (n=30), 40°C (n=30). Head width is a reliable indicator of male body size, the correlation between male fresh weight and head width having previously been shown *in D. basalis* (Lacoume *et al.*, 2006). This measurement was made under a stereomicroscope connected to a computer with picture analysis software (NIH-Image J).

Male fertility after heat treatment

A male is considered to be sub-fertile (marginal fertility or diminished reproductive capacity) if the quantity of sperm contained in its seminal vesicles is lower than the mean quantity stored in the females' spermathecae after a single mating. In *A. calandrae,* the mean is 160 spermatozoa (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). A male was thus considered as sub-fertile if its seminal vesicles contained less than 160 sperm. The criterion for male sterility was complete absence of sperm in the seminal vesicle or in the spermatheca of the mated female.

To evaluate the temperature inducing 50% sterility and 50% sub-fertility, male controls (n=56) and temperature-treated males at 32°C (n=20), 36°C (n=30), 38°C (n=40), 40°C (n=20) were dissected, and the sperm in their seminal vesicles were counted (see general methods above). The numbers of fertile, sub-fertile and sterile males were recorded.

According to preliminary results, 38°C was identified as the temperature level inducing male sub-fertility.

After 38°C treatment, the kinetics of sperm accumulation in seminal vesicles was established to measure male sperm potential in the course of ageing. Sperm in the control and the treated virgin males were counted on the day of emergence (control: n=20, treated: n=20), at 2 days old (control: n=20, treated: n=20), 5 days old (control: n=20, treated: n=16) and 10 days old (control: n=20, treated: n=20). Males were fed with a source of sucrose solution until dissection for sperm count. The relationship between age and the number of fertile, sub-fertile and sterile treated males (38°C) was calculated.

The fitness of heat-stressed and control males were compared through two life history traits: (1) longevity without reproduction, (2) reproductive ability and offspring.

After the 38°C treatment, males were placed individually in small petri dishes with a source of sucrose solution renewed every day. Experiments were conducted in the climatic room at 30°C. The male adult survival rates of control (n=24) and treated males (n=27) were compared. Mortality was recorded every day.

To determine the male mating capacity in single mating, virgin females were individually placed with one young virgin male (day of emergence). Only one copulation was allowed. One group of females (control n=39, 38°C-treated males n=46) was then isolated and

dissected in order to count the spermatozoa stored in their spermathecae, as described previously. The remaining females (control n=18, 38°C-treated males n=39) were individually placed in an oviposition box with seven bruchid-infested cowpea seeds, renewed daily, and a source of sucrose solution. Each seed contained last instar host larvae to encourage female egg-laying (Damiens *et al.*, 2001). Egg-laying occurred over a 14-day period (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). After complete development, the offspring were counted and sexed. Female offspring gave an indication of sperm quality and sperm use by females (Chevrier and Bressac, 2002). All experiments were conducted in the climatic chamber under controlled conditions. Only the offspring of the females which remained alive for 14 days were included in the results.

Statistical analyses

The effect of heat treatment at four high temperatures on reproduction parameters was determined by one-way ANOVAs; a two-way ANOVA was conducted with age and 38°C treatment as factors. The Student's *t*-test was used to compare the values of means from two samples, and the Chi-square test was used to compare proportions.

Longevity data were analyzed using the Log-rank test first proposed by Mantel (1966). This is a nonparametric, hypothesis test used to compare the survival distributions of two samples. Calculations were performed with the statistical package R.

Results

Heat treatment had deleterious effects on development during early nymphal stages (Figure 1). Emergence rates (proportions of emerged adults after temperature treatments at early nymphal stage) were maximal at 30°-38°C, but only 60% at 40°C and 17% at 42°C. As a linear pattern can be observed at 38, 40 and 42°C, [emergence rate=-0.1875 temperature + 0.833], the lethal temperature can be established at 40.3°C and the sub-lethal temperature at 39°C.

With regard to the putative effects on reproduction, two temperatures were eliminated; the maximal temperature, 44°C, which induced a complete failure of development, and 42°C which induced mortality over 50%.

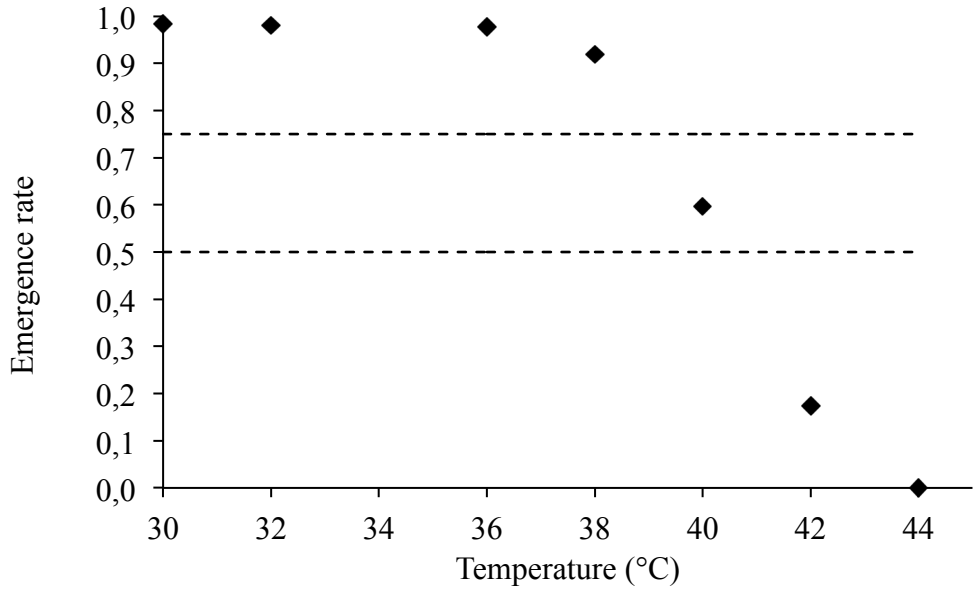


Figure 1 - Emergence rate of males after 3 days of heat treatment at the early nymphal stage. 30°C is the control temperature. Lines indicate 25% and 50% of non-emerging males. Numbers and statistics in text.

Male size was estimated by head width (mm). Temperature treatments (36, 38 and 40°C) did not affect size compared to the control group (30°C) (ANOVA, df=3, F=0.17, p=0.91). No morphological change was observed in emerging males, whatever the temperature treatment.

Sperm in seminal vesicles were counted in males treated at 32, 36, 38 and 40°C (Fig. 2). The mean number differed between the five male groups (ANOVA, df=4, F=64.51,

p<0.001). However, there was no difference between the mean number of sperm in seminal vesicles at 30°C and 32°C (*t.test*, df=36, t=0.81, p=0.42), but higher temperatures (36, 38 and 40°C) had a deleterious effect on male sperm supply. Compared to controls, sperm in the seminal vesicles of males treated at 36°C was about two times lower (Mean±SE: 1288.3±218.7 *vs* 3094.44±180.8, *t.test*, df = 64, t=5.11, p<0.001); about 10 times lower at 38°C (215±70.6 *vs* 3094.44±180.8, *t.test*, df = 49, t=10.64, p<0.001), and 20 times lower at 40°C (136.6±72.5 *vs* 3094.44±180.8, *t.test*, df=42, t=11.69, p<0.001).

In all series, including control, variability was high with a wide difference between minima and maxima. However, heat stress did not increase variability (Figure 2).

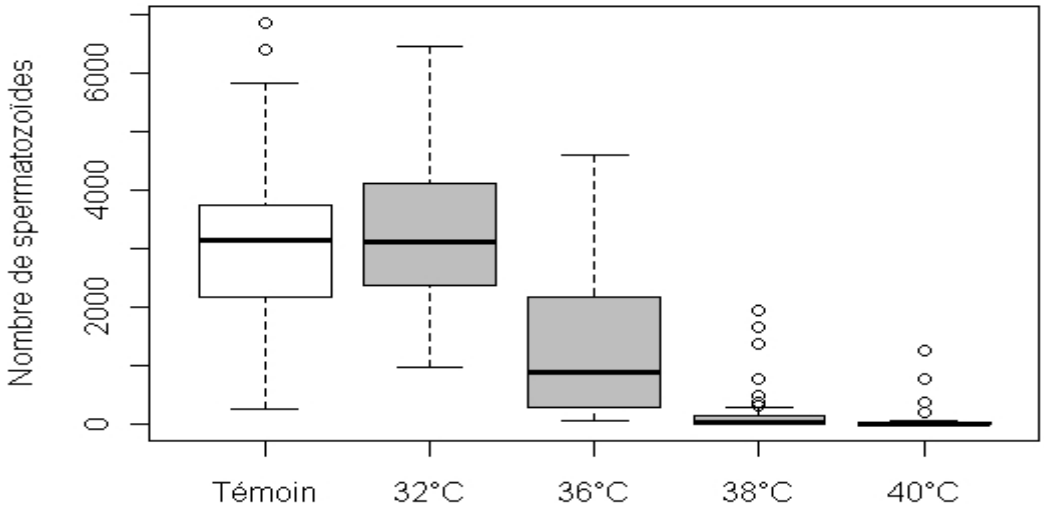


Figure 2 - Sperm in seminal vesicles of heat-stressed A. calandrae males (3 days at early nymphal stage). Virgin males were dissected on the day of emergence. Numbers and detailed statistics in text. Letters indicate differences between series (Student t-tests, p < 0.001)

The number of fertile males changed according to temperature treatments. At 36°C, 10% were sub-fertile and none were sterile; at 38°C, 60% were sub-fertile and 18% sterile; at 40°C, 25% were sub-fertile and 55% sterile (Chi-square test, df=6, Chi^2=112.20, p<0.001).

Consequently, 40°C treatment induced sterility, and 38°C was retained as the temperature inducing sub-fertility in emerging males.

Sperm production according to age in controls and after 38°C temperature treatment is presented in Figure 3. In both male series, the number of spermatozoa increased significantly

with age (two-way ANOVA, Temperature treatment: df=1, F=233.25, p<0.001; age: df=3, F=89.64, p<0.001; interaction: df=1, F=0.001, p=0.9908; no interaction between temperature treatment and age). At all ages, control males had higher quantities of sperm than males treated at 38°C.

In 38°C heat-stressed males, male reproductive potential increased with age: at 2 days, no males were sterile and only 10% were sub-fertile; all males were fertile at 5 and 10 days.

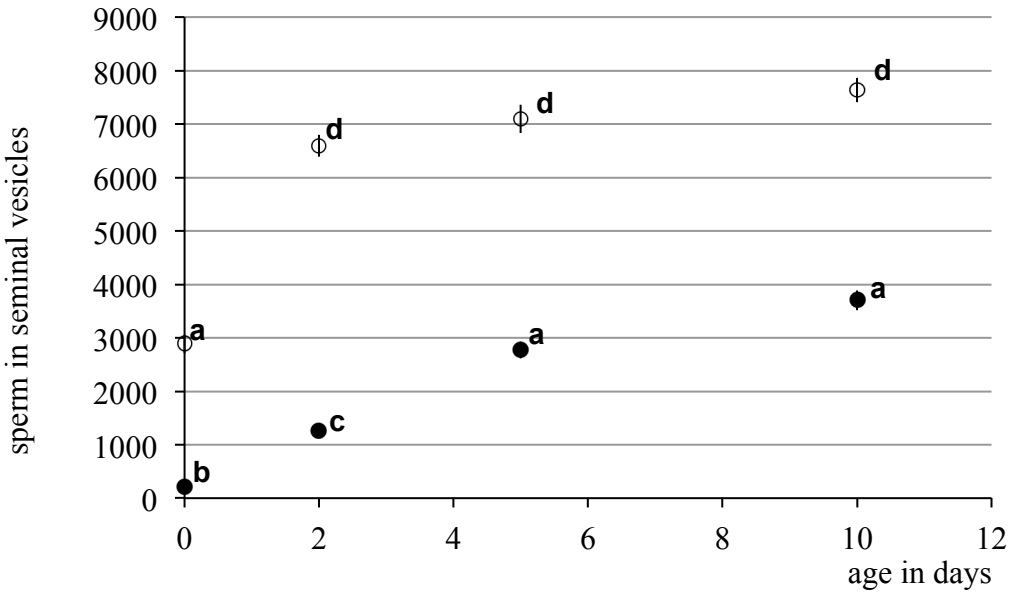


Figure 3 -Mean number of sperm in seminal vesicles of control (30°C - open circles) and heat-stressed virgin *A. calandrae* males (38°C - filled circles) in the course of ageing. Day O corresponds to the emergence day. Bars are mean standard errors. Numbers and de tailed statistics in text. Letters indicate differences between series (student t-test, p<0.001)

Fitness was measured through longevity and effective reproduction. Survival was significantly higher in control than in treated males (Figure 4). The two survival distributions differ significantly (Log-Rank test: df=1, Chi^2=27.73, p<0.001). The 50% mortality level was reached after 21 days in heat-stressed males and 37 days in controls.

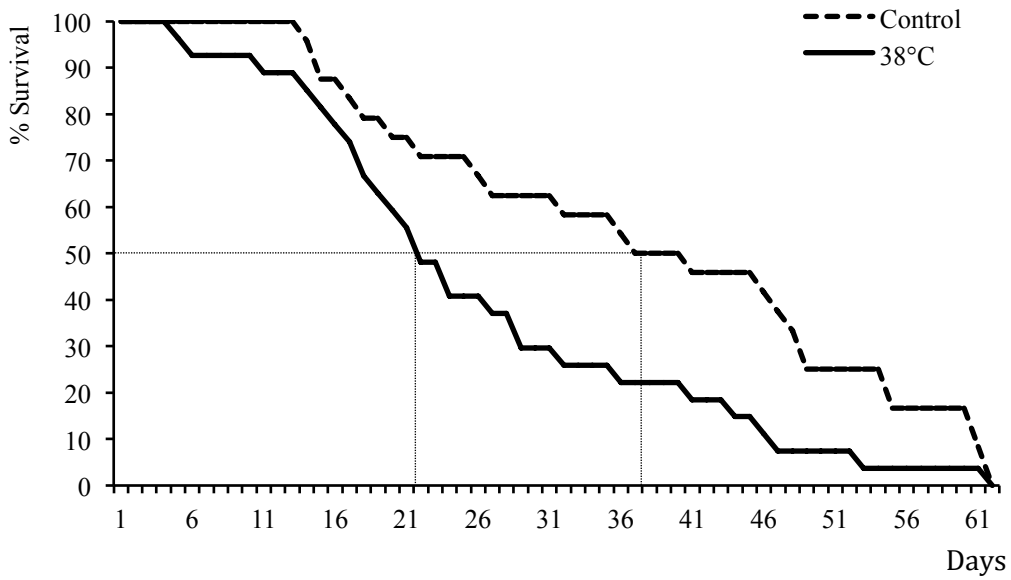


Figure 4 - Survival after temperature treatment at early nymphal stage in *A. calandrae* virgin males with a sucrose source. Horizontal line indicates 50% survival. Numbers and statistics are in the text

In single mating, male mating ability was similar in the two groups (control and 38°C treatment). However, there was a significant difference in the sperm stored by females in their spermatheca (Figure 5). On average, females mated with 38°C-treated males stored 100 times less sperm than those mated with control males, and 57% of them were sterile (no sperm stored). For the females with sperm in their spermatheca, the mean (±SE) was 8.1±2.7. None of those females can be considered as fully fertile, the maximum sperm stored being 51.

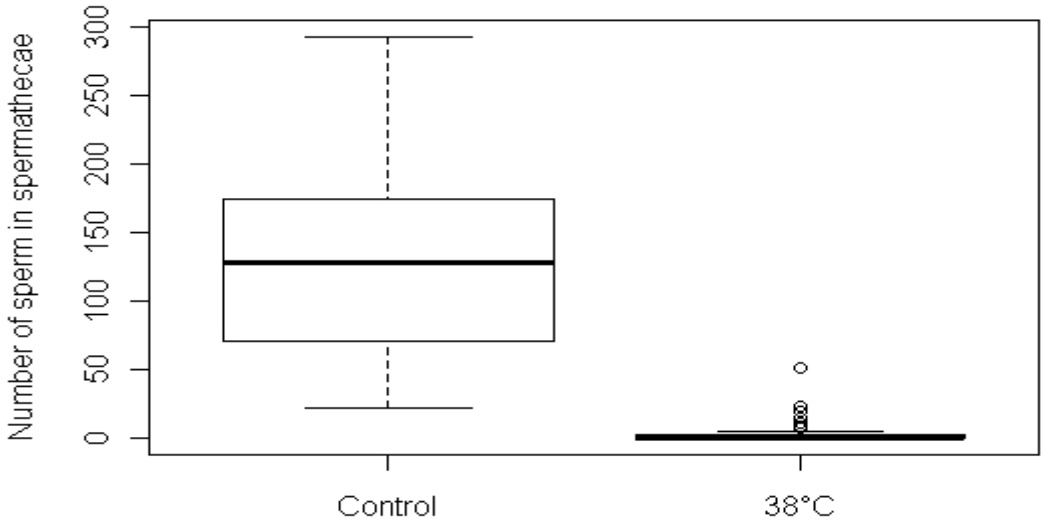


Figure 5 - Sperm counted in spermathecae of *A. calandrae* females mated with either a male stressed for 3 days at 38°C during the nymphal stage (38°C) or one maintained at 30°C (control). Series are highly different, Welch t-test, df=46, t=12.0, p<0.001

Offspring sex ratios of females which mated with 38°C-treated males and with control males are shown in Figure 6. Female offspring were found in both groups, showing that the sperm of heat-stressed males can be fertile. However, the offspring sex ratios of females which mated with 38°C-treated males were strongly male-biased (mean=19% females) while those of controls were female-biased (80%) (Fig. 6); 34% of females laid only males (null sex ratio), and excluding them, the mean sex ratio was 29%, considerably different from controls. However, the maximum sex ratio obtained during the 2 weeks egg-laying period by one female mated with one heat-treated male was similar to the controls (77%).

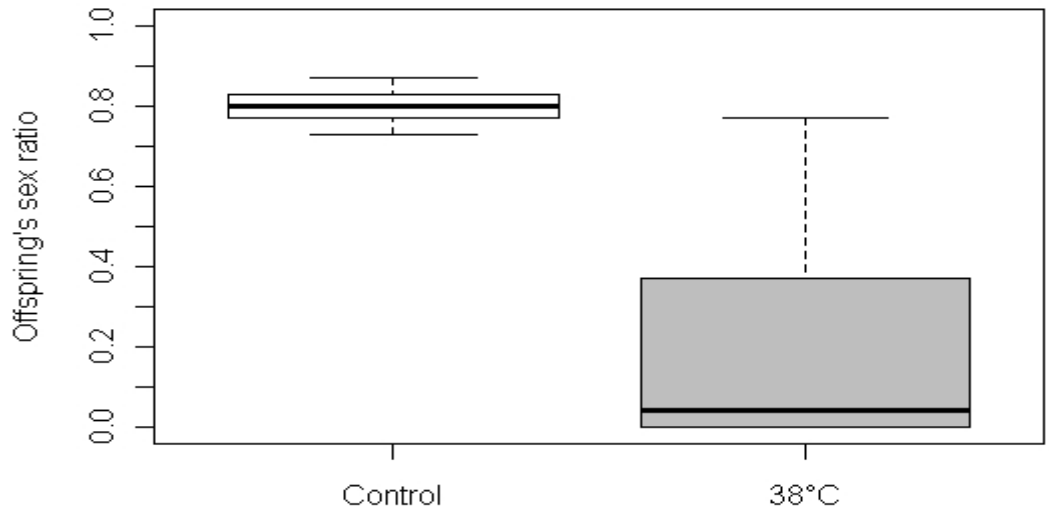


Figure 6 - Offspring sex ratio (females/total) of *A. calandrae* females mated with either a male stressed for 3 days at 38°C during the nymphal stage (38°C) or one maintained at 30°C (control). Sex ratios were treated as quantitative values, series are highly different, Welch t-test, df=41, t=14.3, p<0.001

Discussion

In *A. calandrae,* the final male nymphal stage is temperature sensitive, and the consequences of heat treatment (emergence and overall male reproduction ability) depend on the temperature. Our results show that high temperatures during the early nymphal stage had deleterious effects not only on male emergence and survival, but also on fitness by reducing reproductive capacity. However, not all traits were equally affected by high temperature, the main impact being on sperm production. Temperature treatments (30° to 38°C) had no effect on males' emergence success, but temperatures exceeding 40°C could be lethal; 39°C was considered to be sub-lethal when applied for 3 days at the early nymphal stage. Body size remained constant whatever the temperature treatment, indicating that the sensitivity of males to temperature is not affected by body size. This reinforces observations that parasitoid body size depends mainly on host size in solitary species (Mackauer and Sequeira, 1993; Godfray, 1994; Lacoume *et al.*, 2006).

For surviving heat-treated males, the higher temperatures (36° to 40°C) had a deleterious effect on sperm supply. The level of the effect was temperature-dependent. Lower

quantities of sperm were found in the seminal vesicles of heat-stressed than control males (2 to 20 times lower). The proportion of fertile males at emergence changed according to temperature treatment. After 3 days, males were sterile at 40°C but only sub-fertile at 38°C. However, in *A. calandrae*, unlike other insects (David *et al.*, 2005), there was no evidence of a heat threshold inducing definitive sterility, but rather a continuum from total fertility to sterility by 2°C steps. In many species, temperature steps are narrower, for instance 0.5°C (Jørgensen *et al.*, 2006). As previously shown by Lacoume *et al.* (2007) in *Dinarmus basalis* after a cold shock, our results indicate that heat stress affects sperm production before discharge into seminal vesicles and acts on spermatogenesis but not on mature sperm. The increase in severity of damage to the testis was temperature-dependent. In many insect species, high temperatures disrupt the normal functioning of the reproductive system in both sexes (Arbogast, 1981; Saxena *et al.*, 1992; Chirhane and Laugé, 1997; Mahroof *et al.*, 2005b; Cui *et al.*, 2008).

Due to continuous spermatogenesis, the sperm stocks of heat-stressed males increased during adult life but never reached the level of unstressed males. Production of sperm in adults (imaginal spermatogenesis) has already been reported in several hymenopteran parasitoids (Jacob and Boivin, 2004; Bressac *et al.*, 2008; Lacoume *et al.*, 2007). However, the effects of heat stress on the reproductive functions of *A. calandrae* males were not entirely reversible. A similar effect has been shown in *D. basalis* after a cold shock (Lacoume *et al.*, 2007). The reduction of male fertility caused by heat shock is consistent with studies in the parasitic wasp *Trichogramma brassicae* (Chihrane and Laugé, 1994) and also *D. melanogaster* (Krebs and Loeschcke, 1994), suggesting that it is most likely due to direct damage to late male spermiogenesis (spermatocytes or spermatids), leading to the production of atypical sperm and empty seminal vesicles (Chihrane and Laugé, 1997). In *A.calandrae*, no atypical sperm were found but most males showed empty seminal vesicles or seminal vesicles with low initial sperm stock. Moreover, because the sperm production kinetics of heat-stressed males is less than that of controls, we can suspect damage to cells other than future sperm. There is a lack of data on the functioning of spermatogenesis in hymenoptera focusing on specific cells of the functioning testis. One clear result is that the quality of sperm was not impaired by heat stress, because female offspring were obtained after single mating of heat-stressed males with one female. Similarly, no effect of a difference of sperm quality after a cold shock was reported in *D. basalis* by Lacoume *et al.* (2007). The mechanisms of this sperm decrease are not known and deserve to be studied.

Results show susceptibility at the nymphal stage, especially at 38°C. At this temperature, which are not lethal, males showed reduced longevity and fertility compared to controls, but not a reduced emergence rate. The decrease in adult longevity has been observed in previous studies, but after a cold stress (Coulson and Bale, 1992; Jones and Kunz, 1998), leading to diminished reproductive potential (Rinehart *et al.*, 2000). Nevertheless, the sub-fertility that occurred in treated males was transitory, the males becoming fertile after a few days. Complete fertility was acquired in the first days after emergence, as observed after pesticide (Paraquat) consumption (Lacoume *et al.*, 2009), but earlier in control than in heat-stressed males, causing a fitness disadvantage for heat-stressed males, because females mate soon after emergence, and *A. calandrae* females do not perform delayed multiple mating (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). Heat-stressed males are physiologically sub-fertile, and they probably do not produce offspring when they are competing with unstressed males. Moreover, the reduced survival observed in heat-stressed *A. calandrae* males, although significant compared to controls, may be of little ecological consequence because life expectancy is certainly shorter under natural conditions than in the lab. Our results show that heat-stressed males have a reproductive disadvantage compared to controls as soon as first mating without competition. Under other conditions, for example chemical stress (Lacoume et al, 2009) or sperm depletion due to multiple copulations (Bressac *et al.*, 2008), reproductive disadvantage was only visible when the male was in competition with a control male for access to females or through sperm competition (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). This has also been observed in *Spalangia cameroni* (King and Lee, 1994). Thus, heat stress is more severe than previously documented stresses or sperm depletions tested in this parasitoid wasp.

A direct consequence of heat stress on progeny is the number of sperm-constrained females laying male-biased offspring, and we observed a sharp decrease in the proportion of female offspring. Consequently, the next generation could not have any parasitic activity. These consequences should be considered when assessing to release parasitoids in field conditions which can rise to extreme values of up to 44.9°C in crop storage (Niedermayer *et al.*, 2012). In *A. calandrae,* the maximum number of female offspring is produced between 30 and 36°C, and the cessation of parasitism owing to temperature occurs at 38°C and above (Niedermayer *et al.*, 2012). This may explain why biological control using *A. calandrae* release is ineffective under certain climatic conditions (Smith, 1992, 1993; Niedermayer *et al.*, 2012). The control of storage pests is compromised not only at low temperatures in winter but also at high temperatures in summer (Denlinger and Yocum, 1998).

To conclude, we provide evidence that non-lethal heat stress at the early nymphal stage in *A. calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) has significant consequences on the male's reproductive physiology and fitness. Under lab conditions, a temperature of 38°C induces male sub-fertility by reducing sperm stock, which may subsequently affect the sex ratio of populations. These temperature effects should be generalized to other Pteromalids of ecological, economical (Integrated Pest Management species) or scientific importance (*Nasonia spp*).

Acknowledgements

We thank Cindy Menoret and Eric Imbert for insect rearing and Ahmed Elsabrout for helping us in experiments on females. Elizabeth Yates corrected the English. Thanh Manh Nguyen was supported by a PhD grant of the Vietnamese government.

Chapitre 3
Effets des hautes températures appliquées au stade adulte sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae*

Article 2

Heat shock affects male reproduction in a parasitoid wasp

Thanh Manh Nguyen, Christophe Bressac, Claude Chevrier

In preparation for Journal of Insect Physiology

Abstract

Environmental temperature is one of the most important abiotic factors affecting the behavior, life history and development strategies in insects. Parasitoid wasps are model organisms for studying the consequences of high temperature treated on male reproduction. In these species, through arrhenotoquous parthenogenesis, the sex ratio of the offspring is directly dependent on the sperm stock acquired by females during copulation. In this study, a heat shock (48°C, 10 minutes) was applied in the adult stage of *Anisopteromalus calandrae* males. 48°C is not the lethality temperature of this species but anyway is affects on the mortality, the reproduction and the behavior of male. These different effects were not showed immediately after the shock but 9 days after.

Key words: *Anisopteromalus calandrae*; pupae stage; male fitness; sub-fertility; sperm stock; spermatogenesis.

Introduction

Important gaps of knowledge exist with respect to the tolerance to climatic conditions. So far, most studies on the temperature-dependent performance focused on the "zone of effective temperature" (Girish, 1965), that is the temperature where insects are active, studying sex ratio, development time, longevity and functional. In contrast, almost no studies exist on the influence of extreme temperatures, which occur under natural conditions, for example, the minimum and maximum effective temperature, present in grain stores in winter and in summer (Niedermayer *et al.*, 2012). Any organism exposed to extreme temperatures will realize a variety of detrimental effects. Insects are especially vulnerable to such extremes because of their small size and ectothermic physiology (Lee *et al.*, 1996; Rinehart *et al.*, 2000). In ectothermic organisms temperature plays a vital role in survival and reproductive success. When temperatures exceed an insects optimum temperature range, there are two mutually exclusive results, survival or death (Denlinger and Yocum, 1998). Even, if a species could survive after exposure to heat stress, fitness is probably affected.

Temperature, duration of exposure species, stage of development, acclimatation, relative humidity and gender determine the survival of insects at high temperature (for review to see Fields, 1992) For example, several studies indicate that sexes may differ in their vulnerability to temperature stress. At least some cases females were found to be overall more tolerant to high temperatures than males (Cui *et al.*, 2008, Roux *et al.*, 2010). On the other hand, it is useful to know the general relationship between time and temperature on the survival. Most species will not survive more 24 hr at 40°C, 12 hr at 45°C, 5 min at 50°C, 1 min at 55°C and 30 sec at 60°C (Fields, 1992). Increasing stress temperature and duration both affected male overall reproductive ability by decreasing number of offspring and inducing temporary or permanent sterility (Jørgensen *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2013).

Heat treatment of a whole room or building is currently used for control of many insects especially storage pests (Tang *et al.*, 2007). Temperatures between 44 and 49°C (Pereira *et al.*, 2009) have been cited repeatedly as lethal; besides the lethal effects of heat on insects, sub lethal high temperatures can be detrimental to insects and consequently prevent reproduction (Chang, 1974) Several works have shown that insects surviving exposure to sub-lethal high temperature may exhibit impairments in development, eclosion rhythm, morphology, longevity, fecundity, fertility and over-all fitness; damage varies directly with

temperature exposure (Proverbs and Newton, 1962; Gonen, 1977; Arbogast, 1981; Saxena *et al.*, 1992; Mahroof *et al.*, 2005a,b; Jørgensen *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2008; Niedermayer *et al.*, 2012. However, reproductive traits are thought to be more sensitive to thermal stress than other traits and should therefore be included when estimating the fitness effects of thermal stress (Jørgensen *et al.*, 2006; Zizzari and Ellers, 2011)). Considering the effects of heat stresses on the reproductive capacities, most studies where done on females and very few on males. Moreover, in studies showing results on males, some have focused on both sexes, rendering effects difficult to attribute to one sex (Mironidis *et al.*, 2010); others have tested the effects on males through their capacity to fertilize females (Jorgensen *et al.*, 2006). In rare studies, sperm stocks were measured as the male reproductive capacity (Snook *et al.*, 2000). Regarding reproduction, for instance, heat exposure is known to cause injury to testes and sperm reducing fertility and consequently reproductive success of female mates (Chihrane and Laugé, 1994; Krebs and Loeschcke, 1994; Scott *et al.*, 1997; Rinehart *et al.*, 2000).

Hymenopteran parasitoids are valuable for studying the consequences of heat stress on male reproduction. Previous studies have investigated male spermatic reserves (Chevrier and Bressac, 2002), sperm quality (Damiens *et al.*, 2002), age of the sperm stock (Damiens *et al.*, 2003) and the consequences of variations in sperm quantity for male fitness (Lacoume *et al.*, 2006) in the parasitoid wasp. All these physiological parameters are of primary importance in the sex ratio of haplo-diploid populations, in which fertilized eggs develop into females and unfertilized eggs into males (arrhenotokous parthenogenesis). Thereby, in these species, sperm stocks in both males and females (after copulation) are of major importance. Sperm stock is a key regulator of sex ratio (Nguyen *et al.*, 2013). In males, thermal stress could act on spermatogenesis (Giojalas and Catala, 1993) and decrease sperm production or reduce copulation success (Lacoume, *et al.*, 2007). Thus, the life stage is an important factor in determining tolerance to extreme heat temperature, but which varies in different species (Abdelghany *et al.*, 2010). The experimental temperature stress must occur at a critical phase of spermatogenesis to affect male fertility. In most insects, spermatogenesis starts at an early stage (larvae) and is maximum in pupae when spermatozoa begin to mature and are not yet stored in seminal vesicles (vas deferens) (Chihrane and Laugé, 1994). Moreover, production of sperm as an adult (imaginal spermatogenesis) has already been reported in several hymenopteran parasitoids (Jacob and Boivin, 2004; Lacoume et al, 2007, Nguyen *et al.*, 2013).

In a previous study in *A. calandrae* Howard (Hymenoptera: Pteromalidae), including male reproductive values has been studied under standard laboratory conditions (Do thi Khanh *et al.*, 2005), we have showed that high temperatures during the early pupal stage had deleterious effects varying directly with temperature exposure on male fitness by reducing reproductive capacity (Nguyen *et al.*; 2013). The main impact being on sperm production. For surviving heat-treated males, the higher temperatures (36-40°C) had a deleterious effect on sperm supply. The level of the effect was temperature –dependent. Our results showed susceptibility at the pupal stage, especially at 38°C. At this temperature in stressed males, the sperm stock in freshly emerged individuals was less than half that unstressed males. Nevertheless, heat stress males seemed unable to produce more sperm at a given age, with a persistent time lag between heat-stressed and control males in sperm stock. Thus, the effect of a heat stress was not entirely reversible (Nguyen et al, 2013).

To complete this previously study on the effects of high temperatures applied at the pupal stage on the fitness and population dynamics of male's *A. calandrae*, we have conducted a series of studies on males at the adult stage to know if at this stage the testes had the same susceptibility to severe stress (extreme heat temperature) that at the pupal stage. Under controlled conditions, heat treatments were applied on males at the adult stage from 2 statuses: Virgin and previously mated males. Male fitness after heat shock was studied through survival, sperm output, female offspring and mating ability in male-male competition for sexually experienced males.

Materials and Methods

Insect breeding

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. The strain *A. calandrae* collected from cowpea stocks in Ivory Coast (Africa) was reared in the laboratory since 2000 (Do Thi Khanh *et al.*, 2005; Lacoume *et al.*, 2009) on larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) which develop in cowpea seeds (*Vigna*

unguiculata) and maintained in a climatic room (light: dark periods 12 h: 12 h, temperature 30 °C, relative humidity 65-70 %).

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. So, to obtain male only, virgin *A. calandrae* females were offered each containing one *C. maculatus* at last instar larva (Damiens *et al.*, 2001). Freshly laid eggs were collected and each egg was gently deposited on other *C. maculatus* fresh larvae last instar larva (L4). The development of parasitoids took place in individual holes of a Plexiglas plate in a climatic room (light - dark periods 12 h - 12 h, temperature 30 °C, RH 65-70 %) until the emergence (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). This artificial system allows male larval development to be observed without interference. For all the experiments we used males one day after emergence.

Preliminary study to choice the temperature and duration of heat treatment for subsequently experiments

Preliminary study was done to establish the heat temperatures to achieve 100% of knockdown immediately after treatment and 50% and 100% of mortality (LT_{50} and LT_{100}) 72h after treatment (thresholds issued from conventional literature on survival). Briefly, ten 1-day-old virgin males (vM) were transferred to glass tubes. Tubes were put for 10 min in a water bath and exposed to 45, 46, 47, 48, 49, 50°C during 1 hour. Each treatment consisted of 30 males comprising 10 individuals per tube and 3 tubes per treatment. This experiment for each group was replicated 3 times. After the heat shock, treated males were kept into a climatic room (Light: Dark periods 12h:12h, 30°C, RH 65-70%). Immediately after the heat treatment, we evaluated the proportions of males with normal activity, and knockdown, then 2, 24 and 48 hours after heat treatments. Final mortality counts were recorded 72h later heat treatments. The adults were considered dead if all appendages did not move after touching with a brush. According to preliminary results, 48°C was identified as the sub-lethal temperature. As sub-lethal temperatures can be detrimental to insects (Pereira..) and consequently affected reproduction (Chang, 1974), 72h after heat treatments we counted stored sperm both in virgin males living after 48°C treatment and compared to control males (100% males with normal activity immediately after heat temperature treatments). Males were dissected and sperm contained in their seminal vesicles were counted. Because a similar quantity of sperm was

contained in seminal vesicles (unpublished data), only one of the two seminal vesicles was dissected and the sperm dispersed in a drop of saline solution (128.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.3 mM CaCl2). Spermatozoa were exhaustively counted under a fluorescence microscope after ethanol fixation and DAPI staining (Bressac and Chevrier, 1998). The number of sperm was multiplied by two to obtain the total male sperm reserve.

Previous studies showed that a temperature giving, the proportion of surviving insects was function of the exposure time (Field, 1992;). In a preliminary experiment at sub-lethal temperature (48°C) and 10 min of exposure all males were knockdown, but 2h after 100% had a normal activity.

Subsequently, all experiments will be made at 48°C and an exposure time of 10 min.

The 48°C treatment was applied during 10 min to 2 male statuses: 1-day-old virgin male (vM) and 1-day-old previously mated male (PmM)

Previously mated males were obtained from 1-day-old virgin male placed with five virgin females in a Petri dish for 4h. This time is sufficient for one male to copulate with all females (This was controlled in a preliminary experiment by checking the present of sperm in the spermathecae of all females; Do Thi Khanh, H., 2005; Bressac *et al.*, 2008). This previously mated males had about 723.56±75.94 spermatozoa (personal results) in their seminal vesicles after copulation with 5 females.

For the heat shock experiments as in preliminary experiment, ten 1 day-old virgin males (vM) and ten 1 day-old previously mated males (PmM) were transferred to glass tubes. Tubes were put for 10 min in a water bath and exposed to 48°C. Each treatment consisted of 30 males comprising 10 individuals per tube and 3 tubes per treatment. This experiment for each group was replicated 3 times. The 1-day-old virgin male (vM) or 1-day-old previously mated males (PmM) maintained at 30°C were used as untreated controls. The untreated controls were put in the same conditions that the heat shocked males. Before and after the treatment, treated and untreated males were kept into a climatic room (Light: Dark periods 12h:12h, 30°C, RH 65-70%).

Male survival after high temperature treatment

For the heat shocked males (vM_{48} and PmM_{48}), mortality one day and nine days after treatment were noted. For untreated males (vM_{30} and PmM_{30}) mortality at 2 days and 10 days was also noted. The adults were considered dead if all appendages did not move after touching with a brush.

Male fertility after heat treatment

The fitness of heat shocked from 2 status (vM and PmM) were compared through two life history traits: (1) longevity without reproduction (vM, PmM), (2) reproductive ability (vM, PmM) and offspring for PmM.

After 48°C treatment, stored sperm in males was estimated at 2 days (vM_{48} (n=30); PmM_{48} (n=25)) and 10 days (vM_{48} (n=30); PmM_{48} (n=30)). For untreated males (vM_{30} and PmM_{30}) stored sperm was also evaluated at emergence for virgin male (vM_{30}; n=30) and at 2 days (vM_{30} (n=30); PmM_{30} (n=25)) and 10 days (vM_{30} (n=30); PmM_{48} (n=30)). Males were dissected and sperm contained in their seminal vesicles were counted as described previously.

The co mpetition for access to one female between two males, one 10-day-old previously mated male untreated (PmM_{30}) and one 10-day-old previously mated male heat treated (PmM_{48}) was studied (n=60). Both males were first introduced into a 30 mm diameter Petri dish, followed by a 2h-old virgin female. To distinguish the two males, a white lacquer (Marabuwerke GmbH & Co.) colour spot was put on the thorax of one male 24h before the competition. This mark did not affect the individual mating (Lacoume *et al.*, 2007). Insects were separated immediately after the first copulation. The copulation time and proportion of first copulation by each type of males ($PmM_{30,}$ PmM_{48}) were recorded. The females were individually placed in an oviposition box with 7 bruchid-infested cowpea seeds, renewed daily, and a source of sucrose solution (10% in water). Each seed contained one to three 18-day-old hosts (last instar larvae) (Chevrier and Bressac, 2002). Egg-laying was carried out until the death of females. After complete development of parasitoids, the number of daughter offspring was recorded as a measure of male fertility. The loser of the competition was immediately introduced into a 30 mm diameter Petri dish, followed by another 2h-old virgin female to a single mating. As previously, insects were separated immediately after copulation

and the copulation time was recorded. Egg-laying was carried out as previously and the number of offspring daughter was recorded.

Males' Representativeness Index (M.R.I) in the next generation of each type of males ($PmM_{30,}$ PmM_{48}) which wined the first copulation in male - male competition was estimated. M.R.I. was: sperm stock in seminal vesicle of one male at 10days / number of offspring daughters produced by each female during its reproductive lifespan × proportion of first copulation by each type of males ($PmM_{30,}$ PmM_{48}).

Statistical analysis

The effect of heat stressed to high temperatures on reproduction parameters was determined by one-way ANOVA. The Student's *t*-test was used to compare the values of means from two samples and the Chi-square test was use to compare propotions. Calculations were performed with the statistical package R.

Results

Preliminary experiment

Table 1 showed the consequences of heat treatments from 45° to 50° C on the male activity of *A. calandrae* immediately after treatment and until 72h after treatment. For temperatures between 45° and 46°C, 100% of males had a normal activity after heat treatment during 1h and all males survived 72h after heat treatment. For temperatures between 49° and 50°C, 100% initial knockdown corresponded to 100% final mortality 72h after treatment and for temperatures between 47°C and 48°C, 100% initial knockdown corresponded to 60% final mortality 72h after treatment. In our conditions the upper lethal temperature (ULT) can be established at 50°C and upper sub-lethal temperature (USLT) at 48°C.

Sperm in seminal vesicles were counted in males treated at 46°C and 48°C (USLT) 72h after heat treatment. Compared to males treated at 46°C, sperm in the seminal vesicles of males treated at 48°C was about third times lower (Mean ± SE: 2251.27 ± 185.82 *vs* 3476.60 ± 291.65, *t.test*, $t = 3.5432$, $df = 15.273$, $p < 0.05$).

Table 1 - Measure of acute thermal tolerance of *A. calandrae* males exposed at five different temperatures for varying lengths of times after treatment

Temperature	Immediately after the shock	After 2h	After 24h	After 48h	After 72h
45°C	100% Δ	100% Δ	100% Δ	100% Δ	100% Δ
46°C	100% Δ	100% Δ	100% Δ	100% Δ	100%Δ
47°C	*	*	*	*/Δ	40% Δ
48°C	*	*	*	*/Δ	40% Δ
49°C	*	*	*	*	0% Δ
50°C	*	*	*	*	0% Δ

Δ - normal activity

* - Knockdown or dead

Effect of high temperature treatment on the survival

Survival was estimated in 2 male statuses (vM and PmM) in controls (30°C) and after (48°C) temperature treatment. Whatever the status and treatment, 100% of 2 days old males survived (Fig.1). For control males at 10 days of age, whatever the status, the survival was not significantly decreased (Fig. 1, for vM_{30}: 97.4% *vs* 100%: Chisq, $df = 1$, $F = 4.05$, $p > 0.05$; for PmM_{30}: 90.2% *vs* 100%: Chisq, $df = 1$, $F = 4.21$, $p > 0.05$). At the opposite in shocked males the survival was significantly affected for the 2 male statuses. The proportion of survival in virgin males decreased about 20% compared to 2 days old males (81.3 *vs* 100%: Chisq, $df = 1$, $F = 36.41$, $p < 0.05$) and about 50% in preliminary mated males (55.3 *vs* 100%: Chisq, $df = 1$, $F = 21.90$, $p < 0.05$).

In 10 days old males whatever the status, survival was significantly higher in control males than in treated males (Fig. 1). It was about 16.5% higher in virgin males (97.4% *vs* 81.3%: Chisq, $df = 1$, $F = 21.17$, $p < 0.05$) and about 40% higher in preliminary mated males (90.2% *vs* 55.3%: Chisq, $df = 1$, $F = 12.37$, $p < 0.05$). The longevity was more affected in PmM than vM males (55.3% *vs* 81.3%: Chisq, $df = 1$, $F = 11.77$, $p < 0.05$) (Fig. 1)

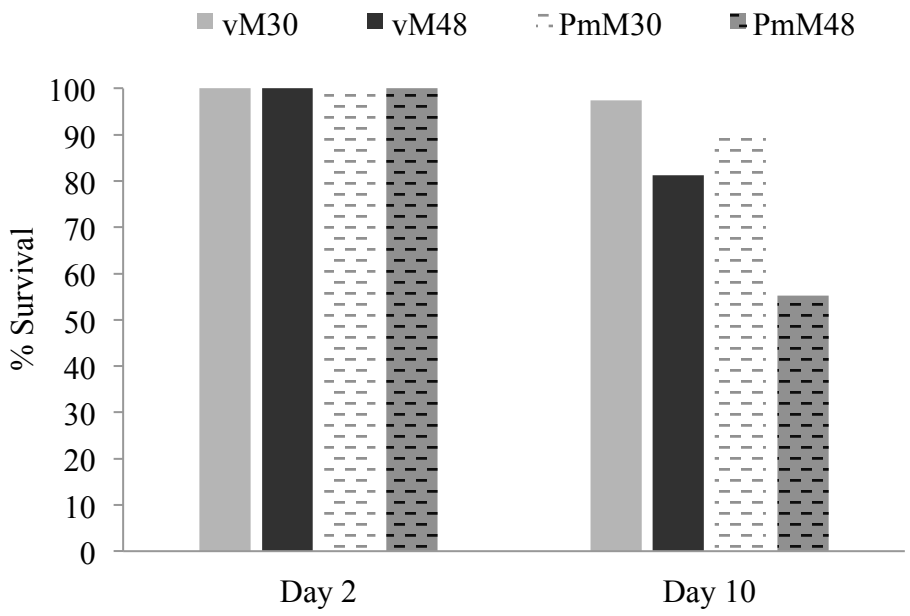


Figure 1 - Survival one day and nine days after high temperature treatment (48°C, 10 min) at adult stage in *A. calandrae* males in 2 statuses: virgin males (vM) and preliminary mated males (PmM). Number and statistics are in the text

Sperm production according to age of males after 48°C heat treatment during 10 min

Sperm production according to age in control and after 48°C treatment for 2 male statuses (vM and PmM) was presented in Fig. 2 In both statuses, for the two series (30° and 48°C), the number of spermatozoa increased significantly with age (Fig. 2, for virgin males: ANOVA: $df = 3$, $F = 61.964$, $p < 0.001$; for premilinary mated males: ANOVA: $df = 3$, $F = 110.45$, $p < 0.001$). In 2 days old males the number of spermatozoa was similar between control (vM_{30}) and treated (vM_{48}) males: (4730.07 ± 262.76 *vs* 4808.60 ± 255.85: *t.test*, $t = 0.2141$, $df = 57.959$, $p > 0.05$). In 10 days old virgin males, control males had higher quantities of sperm than treated males at 48°C (10921.04 ± 433.18 *vs* 7775.67 ± 474.64: *t.test*, $t = 4.8948$, $df = 54.926$, $p < 0.001$) (Fig. 2a).

Similar results were observed in preliminary mated males (PmM) (Fig. 2b). In 2 days old males, the number of spermatozoa was similar between controls and treated males at 48°C (2539.68 ± 172.85 *vs* 1847.92 ± 112.37: *t.test*, $t = 3.3554$, $df = 41.212$, $p > 0.001$) and in 10 days old males, control males had higher quantities of sperm than treated males at 48°C (5836.60 ± 166.98 *vs* 3087.93 ± 195.66: *t.test*, $t = 10.6861$, $df = 56.601$, $p < 0.001$) (Fig. 2b).

In 10 days old males, in the seminal vesicles was about 2.5 times higher in virgin males (vM) than preliminary mated males (PmM) (7775.67 ± 474.64 *vs* 3087.93 ± 195.66: *t.test*, $t = 9.131$, $df = 38.579$, $p < 0.001$).

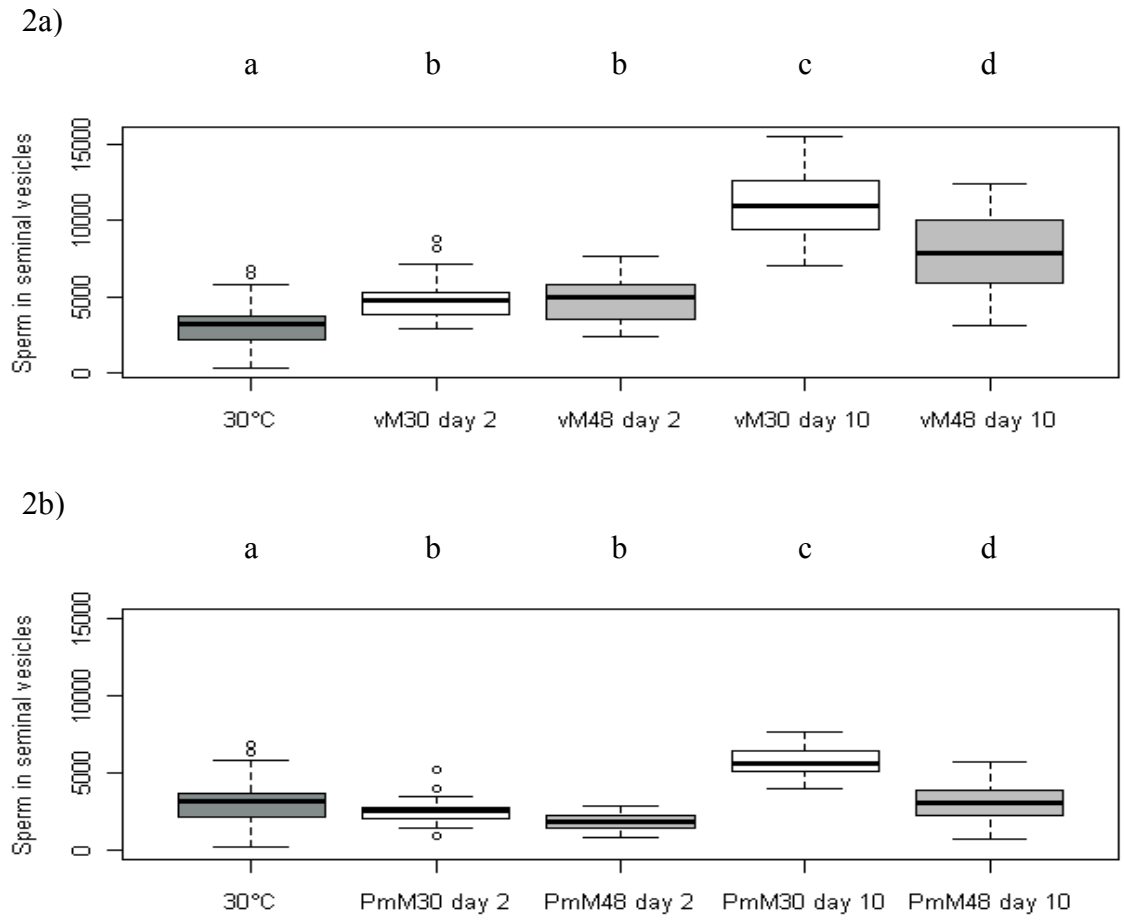


Figure 2 - Sperm counted in seminal vesicles of 2 days old and 10 days old *A. calandrae* males with either a male heat shocked for 10 min at 48°C during the adult stage (one day after emergence) or one maintained at 30°C (control).

*** Sperm counted in seminal vesicles at emergence (Previously counted in Nguyen *et al.*, 2013). Box plot show median (solid line), quartiles as 75% upper and 25% lower (box). Standard deviation (upper and lower bars) and outliers' data (open circles). Number and detailed statistics in the text, Fig. 2a: virgin status (vM), Fig. 2b: preliminary mated males (PmM).**

The capacity of mating and the offspring's sex-ratio

In male-male competition, non heat shocked preliminary mated males (PmM_{30}) copulated more frequently than heat shocked preliminary mated males (PmM_{48})

(60% *vs* 40%). However, there was no difference in copulation time (21.63s *vs* 17.47s, *t.test*, $t = 1.7798$, $df = 51.202$, $p > 0.05$) or daughter offspring of females mated with the winner of male-male competition (0.72 *vs* 0.66, *Chisq.test*, $df = 1$, $F = 10.34$, $p < 0.05$. But the males' representativeness index in the F_1 generation was about 2.5 times for non heat shocked (PmM_{30}) than heat shocked (PmM_{48}) (tab. 2, *Chisq.test*, $df = 1$, $F = 15.71$, $p < 0.05$).

For losers of male-male competition, male mating ability was similar in the two categories (PmM_{30}, PmM_{48}) and there was no difference in the offspring of females mated with either type (63.64 ± 19.19 *vs* 82.70 ± 6.39, *Chisq.test*, $df = 1$, $F = 0.033$, $p > 0.05$

Table 2 - Males' Representativeness Index (MRI*) in F_1 generation of male winners aged 10 days after male-male competition

	Number of sperm In seminal vesicles (A)	**Average of daughters (B)**	**M.R.I***
PmM_{30}	5836,60±166,98	82,94±8,67	42,22
PmM_{48}	3087,93±195,66	74,1±10,18	16,67

Discussion

In *A. calandrae,* the male adult stage as the pupal stage (Nguyen *et al.*, 2013) is temperature sensitive and the consequences of heat treatment (survival and overall male reproductive ability) depend on the temperature. Our results show that extreme hot temperatures applied in very early in males after emergence could have deleterious effects on the survival. Temperature treatments (45°C - 46°C) had no effects on males' survival, because immediately after the thermal treatment males had a normal activity. Temperature exceeding 48°C was lethal, all individuals came in heat stupor or heat coma immediately after heat treatment and none came out of the heat coma in the hours that followed. 48°C was considered to be sub lethal when applied for one hour because 40% of males had a normal activity 72h after heat treatment. In *A. calandrae,* tolerance levels to hot temperatures were well on thermo biological scale defined by Uvarov (1931) and Vannier (1994). However, when exposed at 48°C during 10 min, 100% of males survived 72h after treatment. These

results confirm that a relationship exists between duration of exposure and temperature. Temperature, duration of exposure species, stage of development, humidity and gender determine survival of insects at high temperatures (for review, to see Fields, 1992).

For survival heat-treated males (48°C, 10min), a deleterious effect was observed on sperm supply. 9 days after treatment, lower quantities of sperm were found in the seminal vesicles of heat treated than control males (about 1.4 to 2 times lower depending on the status of the male). Our results show in *A. calandrae,* the testes at the adult stage as at the pupal stage (Nguyen *et al.*, 2013) had a susceptibility to sever stress and that sexually experimented males were more sensitive than non sexually experimented males. As shown in previous studies (Lacoume *et al.*, 2007; Bressac *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2013), the sperm stock of *A. calandrae,* males increased in the course of ageing as well non stressed than stressed males of 2 statuses. This due to continuous spermatogenesis (Nguyen *et al.*, 2013). Production of sperm as an adult (imaginal spermatogenesis) has already been reported in several hymenopteran parasitoids (Jacobs and Boivin, 2004; Bressac *et al.*, 2007). However, in our experiment, 10-day old- heat stressed males of 2 statuses had less of sperm in their seminal vesicles than control males. Similarly the rate of sperm production differed for the 2 statuses (about 2times) compared to controls. The sexually experimented males seemed to be more sensitive than non sexually experimented males. These results differed from those observed after a pupal cold stress (Lacoume *et al.*, 2007) or heat stress (Nguyen *et al.*, 2013) where even though sperm quantity differed between control and stressed males, their rate of production was similar.

Our results show that as the pupal stage the heat shock at the adult stage affects sperm production before sperm discharge in seminal vesicles and acts on spermatogenesis but not on mature sperm. One clear result is that quality of sperm was not impaired by heat stress, because female offspring were obtained after male-male competition or a single mating of heat stressed males with one female. Similarly no effect of a difference after a cold or heat shock at a pupal stage was reported by Lacoume *et al.* (2007) and Nguyen *et al.*(2013). Our results agreed to Chihrane and Laugé (1997) which showed that male germ lines of the parasitoid were sensitive at the high temperatures (44°C). However the testes of adults would be les sensitive that those of pupae which are the developmental stage in which testis formation and spermatogenesis begin (Chihrane and Laugé, 1994; Lacoume *et al.*, 2007). And in arrhenotokous parthenogenetic species (unfertilized eggs become males) in the next

generation the number of females is reduced. Consequently, this generation could not have any parasitic activity (Chihrane and Laugé, 1997, Nguyen *et al.*, 2013). At the opposite in the adult stage in *A. calandrae,* we showed that if heat stress (48°C, 10min) had a deleterious effect on sperm supply, seminal vesicles were not completely empty or had only a few sperm. However, in male-male competition, only one third of heat stressed males won the intrasexual selection and therefore, heat stressed males will have 2.5 times less likely to be represented in the next generation. A fitness disadvantage for stressed males has previously been described in *D. basalis* after a cold shock (Lacoume *et al.*, 2007).

Acknowledgements

We thank Cindy Menoret and Eric Imbert for insect rearing and Ahmed Elsabrout for helping us in experiments on females. Elizabeth Yates corrected the English. Thanh Manh Nguyen was supported by a PhD grant of the Vietnamese government.

Discussion générale sur les effets des stress thermiques (froid ou chaud) appliquées au stade larvaire ou adulte sur quelques traits d'histoire de vie des mâles d'*Anisopteromalus calandrae*

Chez les parasitoides, le succès reproducteur n'est pas seulement pour permettre une perpétuation de l'espèce il est aussi très important pour la lutte biologique contre les insectes nuisibles. Donc il est essentiel que la population se développe durablement et produise des descendants fertiles. Au cours de leur vie, à cause de leur petite taille, les parasitoides doivent faire face aux contraintes écologiques (biologiques et abiologiques) qui peuvent agir directement ou indirectement sur l'individu, impliquant des changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux qui, à leur tour, affectent la survie et notamment le succès reproducteur de l'individu (David *et al.*, 1971 ; Fox et Mousseau, 1996 ; Gauthier *et al.*, 1997 ; Denlinger et Lee, 1998 ; Denlinger et Yocum, 1998).

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux effets des stress thermiques (froids et chauds) sur la fitness des mâles d'hyménoptères parasitoïdes. Ces stress ont été appliqués soit au stade nymphal soit au stade adulte. Les principaux effets sur quelques traits d'histoire de vie sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 3 - Résumé des principaux résultats sur l'influance des stress thermiques (froid ou chaud) appliqués chez *A. calandrae* au stade larvaire et/ou adulte sur quelques traits d'histoires de vie

Stade du développement	**Nymphe blanche**	**Nymphe blanche**	**Adulte**	
Expérience sexuelle avant traitement thermique	-	-	Non	Oui
Stress thermique	15 °C à 5 °C durant 3 jours	32 °C à 44 °C durant 3 jours	48 °C durant 10 minutes	
Traits histoire de vie				
- durée de dévelop-pement	Augmente	Diminue	-	-
- taux d'émergence	Pas d'effet	à 42 °C seulement avec 50 %	-	-
- taille à l'émergence	Constance	Constance	-	-

- nombre de spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales chez les adultes	Pas d'effet/ aux témoins	Diminution/ aux témoins à l'émergence 38 °C mâles hypofertilités 40 °C mâles stériles	-	-
- évolution du stockés avec le temps	-	Augmente sans atteindre le niveau des témoins	Ralentissement / aux témoins à 10 jours	Effet encore plus important
- quantité de spermatozoïdes stockés dans la spermatheque	-	Accouplement mâles hypofertilités (38 °C) avec femelles normales 100 fois moins de spermatozoïdes	-	-
- survie	-	50 % mortalité à 21 jours chez les mâles hypofertilités et 27 jours chez les mâles témoins	-	-
- sex-ratio	-	Biaisé en faveur des mâles	-	-
- compétitivité des mâles stressés	-	-	-	Mauvais compétiteurs

D'après le tableau 4, nous pouvons voir que les stress thermiques n'affectent pas tous les traits d'histoire de vie d'*A. calandrae* de la même manière et ou avec la même intensité. Les stress thermiques froids ou chauds agissent sur la durée de développement. Les stress froids l'augmentent alors que les chauds la diminuent. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Jarosik et Honek (2007). Cependant, il existe une température optimale

(minimale ou maximale) au delà de laquelle la vitesse de développement n'évolue plus ou même est inversée dans le cas des stress thermiques chauds (Fields, 1992 ; Vannier, 1994 ; Denlinger et Yocum, 1998 ; Renault *et al.*, 1999). Notre étude confirme donc que la vitesse de développement des insectes est dépendante de la température. Cependant si les stress aux températures extrêmes semblent avoir des effets délétères sur le développement lorsqu'ils sont appliqués au stade nymphal, nos résultats montrent que les basses températures (15 à 5 °C) n'augmentent pas la mortalité avant l'émergence. *A. calandrae* a donc une capacité de résistance maximale aux basses températures supérieures à 0 °C. A l'inverse une brève exposition au froid (-18 °C durant 10 mn) a un effet délétère sur le développement d'*A. calandrae*. 25 % des mâles n'émergent pas ou émergent avec des anomalies morphologiques (Lacoume *et al.*, 2007). Ces résultats corroborent ceux de Lee et Denlinger (1991) qui montraient que la majorité des insectes avaient une capacité de résistance limitée à des températures basses, inférieures à 0 °C. A l'inverse, les stress thermiques chauds ont un effet délétère sur le développement des mâles d'*A. calandrae* lorsqu'ils sont appliqués précocement au stade nymphal. Au dessus de 38 °C, environ 40 % de mortalité était observée et la température de 42 °C pouvait être considérée comme une température létale. La température de 38 °C était considérée comme une température sublétale.

Quelque soit le stress thermique (froid ou chaud) appliqué au stade nymphal, nos résultats ont montré que la taille des mâles à l'émergence n'était pas affectée. Ces résultats confirment que la taille des parasitoïdes dépend principalement de la taille des hôtes dans les espèces solitaires (Mackaner et Sequeira, 1993 ; Godfray, 1994 ; Lacoume *et al.*, 2006, 2007).

Chez les insectes, dans la littérature, il est rapporté que le succès de la reproduction et la survie sont plus affectés par les stress thermiques et que la reproduction est plus sensible aux stress thermiques que d'autres traits d'histoire de vie (Jørgensen *et al.*, 2006).

Chez *A. calandrae*, nos résultats confirment que les températures extrêmes (froides et chaudes) mais non létales appliquées au stade nymphal ont un effet négatif sur la production de spermatozoïdes. Le niveau de l'altération est dépendant de la température. Bien que nos résultats à des températures froides allant de 15 à 5 °C n'aient pas altéré la production de spermatozoïdes, nous pouvons penser que les traitements thermiques n'étaient pas suffisamment bas. En effet, les travaux sur un autre pteromalidae, effectués au laboratoire par Lacoume *et al.* (2007), ont montré que les mâles qui émergeaient après un choc thermique froid (-18 °C) avaient un stock en spermatozoïdes dans les vésicules séminales plus faible que

les témoins. La proportion de mâles fertiles à l'émergence change en fonction du traitement thermique (36 °C à 40 °C). Après un traitement thermique durant 3 jours, les mâles étaient stériles à 40 °C mais hypofertiles à 38 °C. Cependant, chez *A. calandrae*, comme chez d'autres insectes (David *et al.*, 2005), une valeur seuil de hautes températures induisant une stérilité définitive n'est pas mise en évidence. Il s'agit plutôt d'une augmentation de la stérilité des individus en fonction de l'augmentation de la température par tranche de 2 °C (Do Thi Khanh, et al, 2005 ; Lacoume *et al.*, 2007 ; Bressac *et al.*, 2008 ; Nguyen *et al.*, 2013).

Les stress thermiques ont été appliqués très tôt au stade nymphal, environ sept jours avant l'émergence quand les testicules étaient formés mais pas les vésicules séminales, ni les spermatozoïdes matures (Lacoume, non publié). Nos résultats avec des stress thermiques chauds confirment les résultats de Lacoume *et al.* (2007) après un choc thermique froid. Les stress thermiques appliqués très tôt au stade nymphal altèrent la production de spermatozoïdes avant le stockage dans les vésicules séminales mais n'altèrent pas les spermatozoïdes matures. En effet, la qualité de spermatozoïdes n'était pas diminuée par le stress à la chaleur car après un accouplement avec un mâle stressé, une femelle donne une descendance fille. De la même manière un effet similaire a été rapporté par Lacoume *et al.* (2007) après un choc froid.

Les effets de températures extrêmes mais non létales (hautes et basses températures) sur la gamétogénèse et particulièrement sur la spermatogénèse, ont été précédemment décrits chez *Drosophila melanogaster* (David *et al.*, 1971 ; Cohet, 1973 ; Laugé et Masner, 1974) et chez *Trichogramma brassicae* (Chihrane et Laugé, 1994). La réduction de la fertilité des mâles causée par un stress thermique pourrait être due à des dommages directs sur les étapes précoces de la spermatogénèse (spermatocytes ou spermatides), conduisant à la production de spermatozoïdes atypiques et à des vésicules séminales vides (Chihrane et Laugé, 1997). Chez *A. calandrae*, nous n'avons pas trouvé de spermatozoïdes atypiques, cependant la majorité des mâles montrait des vésicules séminales vides ou des vésicules séminales avec un faible stock initial de spermatozoïdes. Dans notre expérimentation, nous avons montré que 10 jours après émergence, les mâles stressés vierges comme les mâles témoins avaient plus de spermatozoïdes dans leurs vésicules séminales qu'à l'émergence. Cela indique que les mâles continuent à produire des spermatozoïdes à l'âge d'adulte. Cependant, les mâles stressés ne rattrapent jamais la production des mâles témoins. C'est à dire que l'effet du stress thermique n'est pas completement réversible. Même si la quantité de spermatozoïdes diffère entre deux catégories de mâles du même age, le taux de production de spermatozoïdes est identique. En

accord avec ces résultats, nous montrons que la spermatogénèse est interrompue après un stress thermique chaud mais pas completement inhibée. Des résultats similaires étaient obtenus après un choc froid (Lacoume *et al.*, 2007). Ou après une consommation d'un pesticide (Paraquat) au stade larvaire (Lacoume *et al.*, 2009). Le mécanisme physiologique responsable de la restauration de la spermatogénèse après un stress thermique n'est pas bien connu. Cependant, il a été montré récemment que les « heat shock proteins (HSPs)» synthétisées en réponse à plusieurs formes de stress (Denlinger et Lee, 1998, Sørensen *et al.*, 2003) pourrait avoir un rôle protecteur chez des espèces de Drosophiles (Joplin *et al.*, 1990 ; Denlinger *et al.*, 1991 ; Michaud *et al.*, 1997 ; Sarup *et al.*, 2004). Un mécanisme semblable pouvait être impliqué chez *A. calandrae* et expliquer sa résistance aux stress thermiques.

Comme la spermatogénèse est continue à partir de l'émergence durant toute la vie reproductive des mâles (Do Thi Khanh *et al.*, 2005 ; Bressac *et al.*, 2008, Lacoume *et al.*, 2007), pour confirmer que le stress thermique avait pour cible les étapes précoces de la spermatogénèse, nous avons effectué un choc thermique de courte durée à très forte température (48 °C, 10 minutes) sur des mâles adultes après émergence, sans expérience sexuelle ou avec expérience sexuelle (mâles déplétés après plusieurs accouplements) (Do Thi Khanh *et al.*, 2005). Nos résultats montrent pour la première fois que chez l'adulte soumis à un stress thermique, le nombre de spermatozoïdes trouvé dans les vésicules séminales 9 jours après le stress était significativement plus faible que chez les témoins. Cet effet était surtout plus important lorsque les mâles avaient eu une expérience sexuelle. Le stock de spermatozoïdes dans les vésicules séminales n'augmente pratiquement plus avec le temps.

Ainsi les hautes températures semblent être plus sévères que les autres stress chez les parasitoïdes. Une conséquence directe des stress chauds sur la descendance est l'augmentation du nombre de femelles mal inséminées qui produisent donc une sex-ratio biaisée en faveur des mâles et nous observons une forte diminution dans la proportion de descendantes filles. Par conséquence, la génération suivante pourrait avoir aucune activité parasitaire.

Chez *A. calandrae*, le nombre maximum de descendantes filles est produit entre 30 et 36 °C et la cessation de parasitisme apparait à 38 °C ou à des températures supérieures (Niedermaer *et al.*, 2012) Ceci peut expliquer pourquoi la protection biologique des cultures par l'utilisation d'*A. calandrae* peut être efficace sous certaines conditions climatiques (Smith, 1992, 1993[1] ; Niedermaer *et al.*, 2012). Le contrôle des stocks de graines est compromis non seulement à basse température en hiver mais également à haute température

en été (Denlinger et Yocum, 1998). De tels effets de stress thermique à haute température sur la production de spermatozoïdes par les mâles entraînant une altération de la sex-ratio ne sont pas spécifiques aux parasitoïdes mais existent chez toutes les espèces d'hyménoptères incluant les espèces pollinisatrices. Cela pourrait avoir des répercussions non seulement économiques mais également écologiques avec une altération de la biodiversité.

Perspectives

Perspectives

La pérennité d'une espèce n'est possible que si la population se maintient et conserve sa capacité à produire des descendants viables et fertiles. En dépit des contraintes environnementales, elle doit préserver son potentiel de reproduction, voire conserver une certaine particule phénotypique. L'organisme, pour se conformer aux nouvelles conditions environnementales, peut acquérir des caractères impliquant des changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux pour augmenter sa survie et son succès reproducteur dans un environnement particulier.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à déterminer :

1) si une même contrainte thermique, appliquée au stade nymphal ou au stade adulte, affectait de la même manière les capacités de reproduction d'un mâle.

2) si les individus soumis à des contraintes environnementales différentes au cours du développement (densité en hôtes, stress thermiques froids ou chauds) s'adaptaient en acquérant des caractères impliquant ou non les mêmes changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux. Autrement dit, si les mécanismes mis en place pour s'adapter à des contraintes environnementales différentes étaient identiques ou non.

Nos résultats ont montré qu'un stress thermique chaud appliqué au stade nymphal ou sur un mâle adulte altérait les capacités de reproduction des mâles. A l'inverse, des stress thermiques froids appliqués au stade nymphal ne les altéraient pas. Cela montre que les contraintes environnementales peuvent avoir des conséquences différentes sur les mécanismes de la reproduction.

A l'émergence, les mâles ayant subi un stress thermique au cours du développement présentaient les mêmes modifications physiologiques et comportementales que les mâles adultes qui avaient subi un stress thermique (choc chaud). Dans les deux cas, nous avons constaté une réduction de la quantité de spermatozoïdes présents dans les vésicules séminales des mâles. Celle-ci est accentuée lorsqu'il y a eu une expérience sexuelle avant le stress. Cette forte diminution du stock de spermatozoïdes par rapport à des mâles développés dans des conditions optimales n'empêche aucunement les mâles de copuler lorsqu'il s'agit d'un accouplement simple. Néanmoins, lors de compétitions entre mâles, les mâles ayant subi un

stress thermique durant leur développement ou au cours de la vie adulte sont défavorisés par rapport à des mâles qui n'ont pas subi de contraintes. Seulement 40% de ceux ayant subi un stress thermique gagnent la competition.

Dans le cadre de cette contrainte thermique, la différence dans la quantité de spermatozoïdes est certainement liée à une altération passagère de la gamétogénèse. En effet, les études réalisées au cours de cette thèse ont montré que les mâles qu'ils soient vierges ou qu'ils aient eu une expérience sexuelle avant le stress thermique, continuent à produire des spermatozoïdes. Par contre, les vitesses de production de spermatozoïdes sont différentes. Il est fort probable qu'un stade de la spermatogénèse ait été altéré durant le choc thermique et qu'ensuite la gamétogénèse ait repris son cours normal, comme c'est le cas par exemple chez *Triatom infestans* (Giojalas et Catala, 1993).

Nos résultats, à la différence d'autres auteurs (Lacoume *et al.*, 2006), montrent que la gamétogénèse au stade adulte chez *A. calandrae* est aussi sensible au stress thermique qu'au stade nymphal, stade où la formation des testicules et le début de la spermatogénèse se produisent (Lacoume *et al.*, 2007). Comme la spermatogénèse chez *A. calandrae* est continue à partir de l'émergence durant toute la vie reproductive des mâles (Do Thi Khanh *et al.*, 2005 ; Lacoume *et al.*, 2007 ; Bressac *et al.*, 2008), il est probable que le stress thermique par la chaleur ait pour cible les étapes précoces de la spermatogénèse. De plus, des études faites sur des stress thermiques élevés ont montré une plus grande sensibilité de certains stades par rapport à d'autres (David *et al.*, 1971 ; Chihrane et Laugé, 1994 , 1997). Chez *Drosophila melanogaster*, David *et al.* (1971) ont émis l'hypothèse que la période de la gamétogénèse mâle la plus sensible à la chaleur se situerait au début de la spermatogénèse. Comme chez *Drosophila buzzati* (Jørgensen *et al.*, 2000), la fertilité des mâles d'*A. calandrae* est dépendante de la température. L'augmentation de la température réduit la fertilité voire entraîne, à partir d'une certaine valeur, la stérilité. Un résultat identique a précédemment été rapporté par Zizzari (2011).

Notre travail ne nous permet pas de connaître les stades de la spermatogénèse perturbés par le stress car la spermatogénèse d'*A. calandrae* n'a pas été étudiée en détail. Néanmoins, afin d'apporter une réponse concrète sur le mécanisme responsable de la diminution du nombre de spermatozoïdes chez les mâles, il faudrait faire des coupes histologiques des testicules de mâles témoins et stressés.

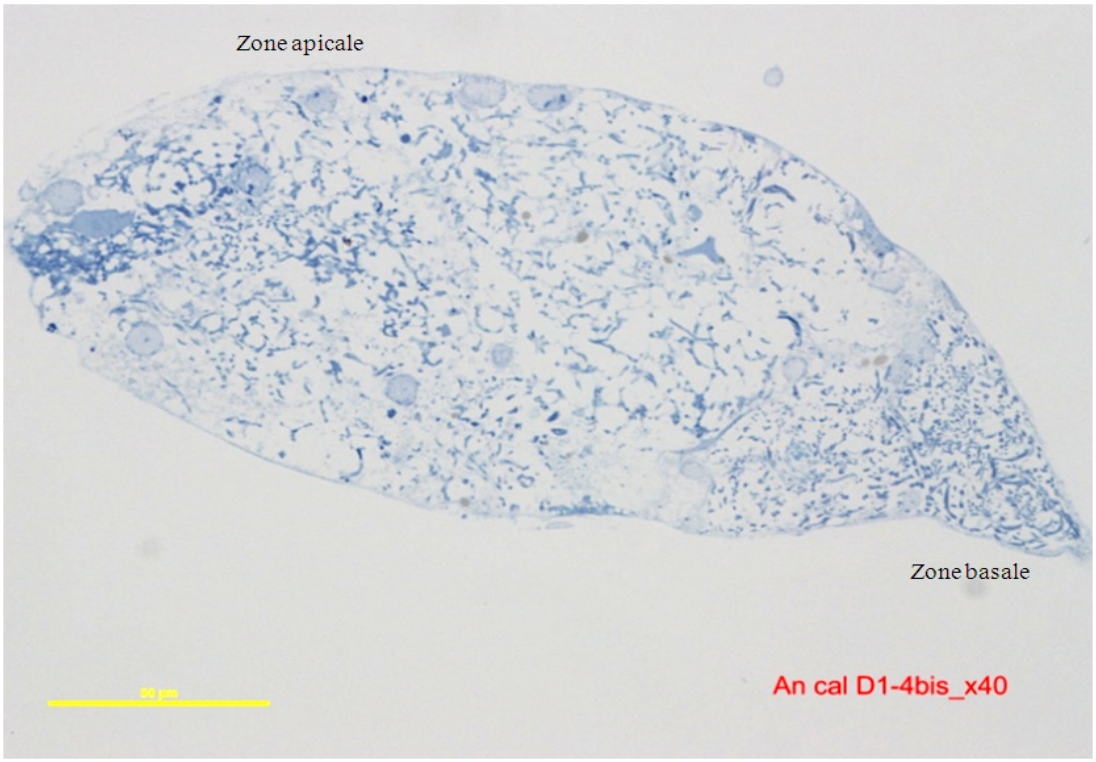


Figure 25 - Coupe longitudinale dans le testicule d'*A. calandrae* non stressé (Mauricette OUALI N'GORAN S-W)

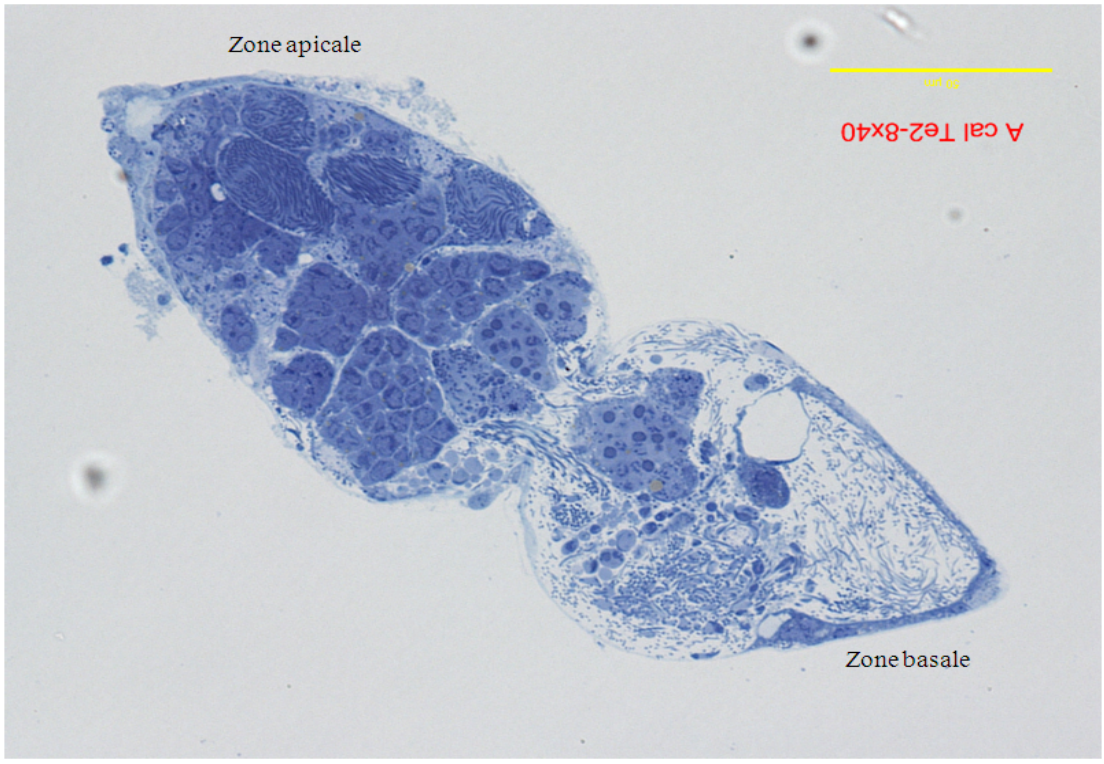


Figure 26 - Coupe longitudinale dans le testicule d'*A. calandrae* ayant subi un stress thermique (Mauricette OUALI N'GORAN S-W)

Nos résultats suggèrent une atteinte de cellules initiatrices de la spermatogénèse (cellules souches, spermatogonies). Chez la plupart des cellules sensibles à la température *(*spermatocytes au stade pachytène et spermatides rondes (Chowdhary et Steinberger, 1970 ; Kandeel et Swerdloff, 1998), l'apoptose serait induite « via » un chemin mitochondrial activant la protéine Bax (Yamamoto *et al.*, 2000). Une diminution de l'expression de gènes de réparation de l'ADN (Ogg1, Xpg, Rad 54, PARP par exemple) a été signalée après un stress thermique (Tramontano *et al.*, 2000). A l'inverse, l'augmentation de l'expression de protéines de choc thermique, les HSPs (Heat Shock Proteins) comme HSP 70-1 et HSP 70-3, est observée par exemple dans les spermatocytes 4 heures après chauffage durant 20 minutes à 43 °C (Rockett *et al.*, 2001). Chez *Drosophila buzzati* (Sarup *et al.*, 2000) par exemple, la spermatogénèse semble protégée par le HSPs. De plus, il semblerait que les cellules germinales soient plus sensibles aux dommages oxydatifs liés à une hyperthermie (Rockett *et al.*, 2001).

Ainsi, pour mieux comprendre comment un stress thermique induit une diminution du nombre de spermatozoïdes produit et jamais rattrapé au cours de la vie reproductive, ll serait intéressant de travailler en plusieurs temps. Tout d'abord, dans un premier temps, l'avancée de la spermatogénèse chez la nymphe au moment du choc thermique en mettant en évidence les cellules cibles de ce stress puis d'analyser comment la spermatogénèse est perturbée chez les adultes stressés.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant de quantifier l'expression de marqueurs de différents types de cellules (cellules germinales aux différents stades de différenciation, cellules somatiques par immunologie et PCR en temps réel) et d'analyser le taux d'apoptose des cellules testiculaires après stress.

Dans un troisième temps, nous pourrions nous intéresser à la détermination des médiateurs intervenant dans le contrôle de la spermatogénèse. Les phénotypes seraient caractérisés par analyse moléculaire (analyse de récepteurs hormonaux), métabolique (protéines, lipides et sucres) et endocrinienne (dosages hormonaux). Chez les insectes, des études ont montré que des agonistes du récepteur aux ecdystéroides perturbaient les fonctions de reproduction mâle (Davies *et al.*, 2006). Par exemple, l'exposition au bisphénol A modifie les niveaux d'expression du récepteur à l'ecdysone (Planello *et al.*, 2008). Aussi il serait nécessaire de quantifier les niveaux d'ecdysone (et son hétérodimère *VS*P). A terme, une

invalidation par ARN interférence d'un de ces récepteurs pourrait être envisagée chez la larve de Nasonia pour laquelle la technique a déjà été publiée (Verhulst *et al.*, 2010).

Nous avons également montré que les mâles « stressés » sont désavantagés au cours d'une compétition intra sexuelle car en moyenne seuls 40% d'entre eux gagnent la compétition. Des résultats similaires ont été rapportés par Lacoume *et al.* (2006 ; 2007). Après un stress alimentaire ou après un choc froid, l'issue de la compétition entre mâles pour l'accès à la femelle serait liée aux caractéristiques propres des mâles et non pas au choix des femelles (Lacoume, 2007). Ceux qui se sont développés en conditions optimales seraient plus aptes à localiser la femelle et à s'accoupler avec elle en premier. La perte de la compétition pourrait être due à des anomalies de fonctions neuromusculaires sensibles à la température. En effet, les informations olfactives des insectes sont analysées dans les lobes antennaires (Hansson et Anton, 2000) et une altération de celles-ci pourrait provoquer une diminution des capacités des mâles à détecter des phéromones (Dallaire *et al.*, 2004). Une étude portant sur ces paramètres permettrait de connaître si la diminution de la fitness des mâles après un stress à la chaleur était due à une altération concomitante de la gamétogénèse et du système neurosensoriel.

Nos résultats ont également montré que des contraintes environnementales différentes (augmentation de la densité en hôtes, stress thermiques), appliquées soit sur les femelles en ponte soit sur leur descendance au cours du développement, n'avaient pas les mêmes conséquences sur le phénotype de la descendance.

Aucune altération visible du phénotype n'a été constatée chez les individus ayant subi un stress thermique (chaud ou froid) au stade nymphal alors qu'une augmentation de la densité en hôtes dans les patchs de ponte entraînait une diminution de la taille des descendants.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les individus de petite taille proviendraient d'œufs de plus petite taille. Il serait donc intéressant de mesurer la dimension des œufs pondus par les femelles en fonction de la densité en hôtes. D'autre part, il serait également important, chez les mâles de petite taille, de déterminer à l'émergence la quantité de spermatozoïdes produits afin de connaître s'il y a une valeur limite de la densité en hôtes au delà de laquelle les mâles pourraient être considérés comme hypofertiles. Enfin, en fonction de la taille des œufs, nous pourrions appliquer un stress thermique chaud afin de vérifier,

d'une part, si la survie des mâles provenant de gros œufs sont supérieurs à ceux provenant de petits œufs et d'autre part, si les proportions de mâles hypofertiles ou stériles obtenus seraient les mêmes dans le cas de descendants provenant de gros ou petits œufs.

Une étude portant à la fois sur l'effet de la densité en hôtes sur la qualité des œufs pondus par les femelles et sur l'effet d'un stress thermique chaud ou froid au cours du développement permettrait d'évaluer le succès reproducteur du mâle au niveau d'une population et aiderait à mieux cerner l'influence des variations de la réserve spermatique d'un mâle sur sa fitness.

Au sein d'une population, les individus diffèrent par leurs traits d'histoire de vie. Les mâles peuvent être vierges, jeunes, sexuellement expérimentés, avoir une réserve spermatique importante (mâles fertiles) ou faible (mâles hypofertiles, stériles). Tous ces mâles peuvent se retrouver confrontés les uns aux autres pour accéder aux femelles. Ils doivent donc parvenir à les localiser, copuler avec elles et leur transférer des spermatozoïdes qui seront ensuite utilisés par la femelle pour fertiliser ses œufs et produire une descendance. En nous basant uniquement sur leurs caractéristiques physiologiques (âge et condition de développement) et en nous plaçant dans différents contextes populationnels, nous pourrions, tout au moins en partie, déterminer l'influence de ces résultats physiologiques sur le potentiel de reproduction d'un mâle d'*A. calandrae*.

Bibliographie

Abdelghany, A.Y., Awadalla, S.S., Abdel-Baky, N.F., El-Syrafi, H.A. & Fields, P.G., 2010. Effect of high and low temperatures on the drugstore Beetle (Coleptera: Anobiidae). Journal of Economic Entomology, 103, 1910-1914.

Abril, S., Oliveras, J. & Gómez, C., 2010. Effect of temperature on the development and survival of the Argentine ant, *Linepithema humile*. Journal of Insect Science, 10, 1-13.

Adler, C., 2002. Efficacy of heat treatments against the tobacco beetle *Lasioderma serricorne* F. (Col., Anobiidae) and the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* F. (Col., Bostrichidae). In: Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection, York, UK, 22-26th July 2002, Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E., (Eds.) CAB International, Wallingford, 617-621.

Aganon, T.M. & Adhikari, D.R., 2004. Utilization of Trichogramma parasitoid as biological control agent against sunflower headworm *Helicoverpa armigera* Hubner. Special edition on Biocontrol and Biotechnology, 4 (1).

Ahmed, K.S., 1996. Studies on the ectoparasitoid *Anisopteromalus calandrae* How. (Hymenoptera: Pteromalidae) as a biological agent against the lesser grain borer *Rhizopertha dominica* (Fab.) in Saudi Arabia. Journal of Stored Product Research, 32 (2), 137-140.

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.

Alford L., 2010. The thermal macrophysiology of core and marginal populations of the aphid *Myzus persicae* in Europe. Thesis of The University of Birmingham. 156p.

Altuntas, H., Kilic, A.Y. & Zeytinoglu, H.S., 2010. The effects of parasitism by the ectoparasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) on host hemolymph proteins in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Turkish Journal of Zoology, 34, 409-416.

Amarasekane, K.G., Chong, J.H., Epsky, N.D. & Mannion, C.M., 2008. Effect of temperature on the life history of the mealybug *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae). Journal of Economic Entomology, 101 (6), 1798-1804.

Arbogast, R.T., 1981. Mortality and reproduction of Ephestia cautella and Plodia interpunctella exposed as pupae to high temperature. Environmental Entomology 10, 708-711.

Arbogast, R.T. & Mullen, M.A., 1990. Interaction of maize weevil (Coleoptera : Curculionidae) and parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) in a small bulk of stored corn. Journal of Economic Entomology, 83, 2462-2468.

Armstrong, G.A.B., Rodriguez, E.C. & Robertson, R.M., 2012. Cold hardening modulates K^+ homeostasis in the brain of *Drosophila melanogaster* during chill coma. Journal of Insect Physiology, 58, 1511-1516.

Aung, K.S.D., Takagi, M., Myint, Y.Y., Tun, K.M. & Ueno, T., 2011. Effect of host density on the progeny production of the egg parasitoids *Ooencyrtus nezarae* (Ishii) (Hymenoptera: Encyrtidae). Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 56 (1), 71-74.

Baaren J.V., Boivin, G. & Outreman, Y., 2006. Deleterious effects of low temperature exposure on learning expression in parasitoid. International Journal of Coparative Psychology, 19, 368-385.

Bale, J.S., 1987. Insect cold hardiness - freezing and supercooling - an ecophysiological perspective. Journal of Insect Physiology, 33, 899-908.

Bale, J.S., 1991. Insects at low temperature - a predictable relationship. Functional Ecology, 5, 291-298.

Bale, J.S., Hansen, T.N., Nishino, M. & Baust, J.G., 1989. Effect of cooling rate on the survival of larvae, pupariation, and adult emergence of the gallfly *Eurosta solidaginis*. Cryobiology, 26, 285-289.

Bale, J.S., Masters, G.J., Hodkinson, I.D., Awmack, C., Bezemer, T.M., Brown, V.K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J.C., Farrar, J., Good, J.E.G., Harrington, R., Hartley, S., Jones, T.H., Lindroth, R.L., Press, M.C., Symrnioudis, I., Watt, A.D. & Whittaker, J.B., 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. Global Change Biol. 8, 1-16.

Baldassari, N., Martini, A., Cavicchi, A. & Baronio, P., 2005. Effects of low temperatures on adult survival and reproduction of *Rhyzopertha dominica*. Bulletin of Insectology, 58 (2), 131-134.

Barbault, R., 2008. Écologie générale - 6ème édition - Structure et fonctionnement de la biosphère: Structure et fonctionnement de la biosphère

Barker, P.S., 1990. Note on the effect of low temperatures on the survival of immature stages of the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus*. Phytoprotection, 71, 37-39.

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.

Begon, M. & Parker, G.A., 1986. Should egg size and clutch size decrease with age? Oikos 47, 293-302.

Bernardo, J., 1996. The particular maternal effect of propagule size, especially egg size : patterns, models, quality of evidence and interpretation. American Zoology, 36, 216-236.

Boivin, G., 2001. Parasitoïdes et lutte biologique : paradigme ou panacée ? VertigO - La revue en sciences de l'environnement. http://vertigo.revues.org/4096

Bonet, A., 2002. Parasitoid Wasps, Natural Enemy of Insects. Tropical Biology and Conservation Management. Encyclopedia of Life Support Systems. Vol. VII.

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.

Bressac, C., Damiens, D. & Chevrier, C., 2008. Sperm stock and mating of males in a parasitoid wasp. Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol), 310B, 160-166.

Bressac, C., Do Thi Khanh, H. & Chevrier, C., 2009. Effects of age and repeated mating on male sperm supply and paternity in a parasitoid wasp. Entomologia Experimentalis et Applicata, 130, 207-213.

Brett, J.R., 1971. Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Onchorynchus nerka*). American Zoology, 11, 99-113.

Burks, C.S., Hagstrum, D.W. & Baker, J.E., 1999. Selection of cold injury treatments to facilitate release of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) reared on the rice weevil (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Economic Entomology, 92 (2), 473-479.

Cano, J.M. & Nicieza, A.G., 2006. Temperature, metabolic rate, and constraints on locomotor performance in ectotherm vertebrates. Functional Ecology, 20, 464-470.

Castillo, J., Jacas, J.A., Pena, J.E., Ulmer, B.J. & Hall, D.G., 2006. Effect of temperature on life history of *Quadrastichus haitiensis* (Hymenoptera: Eulophidae), an endoparasitoid of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). Biological Control, 36, 189-196.

Chang, K.P., 1974. Effects of elevated temperature in the mycetome and symbiotes of the bed bug, *Cimex lectularius*. Journal Invertebrate Pathology, 23, 333-340.

Charlesworth, B., 1980. Evolution in age-structured population. Cambridge University Press, Cambridge, 300p.

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

Charnov, E.L., 1979. The genetical evolution of patterns of sexuality: Darwinian fitness. American Naturalist, 113, 465-480.

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.

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

Charnov, E.L. & Skinner, S.W., 1984. Evolution of host selection and clutch size in parasitoid wasps. Florida Entomologist. 67, 5-21.

Charnov, E.L. & Skinner, S.W., 1985. Complementary approaches to the understanding of parasitoid oviposition decisions. Environement Entomology, 14, 383-391.

Charnov, E.L. & Skinner, S.W., 1988. Clutch size in parasitoids: the egg production rate as a contraint. Evolutionary Ecology, 2, 167-174.

Chevrier, C. & Bressac, C., 2002. Sperm storage and use after multiple mating in *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal of Insect Behavior, 15, 385-398.

Chihrane, J. & Laugé, G., 1994. Incidences de chocs de températures élevées sur la lignée germinale mâle de *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hym. : Trichogrammatidae). Entomophaga , 39, 11-20.

Chihrane, J. & Laugé, G., 1997. Thermosensibilité des lignées germinales de *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera). Conséquences sur l'efficacité du parasitoïde. Canadian Journal of Zoology, 75, 484-489.

Choi, W.I., Yoon, T.J. & Ryoo, M.I., 2001. Host-size-dependent feeding behaviour and progeny sex ratio of *Anisopteromalus calandrae* (Hym., Pteromalidae). Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. ISSN 0931-2048. Journal of Applied Entomology, 125, 71-77.

Chowdhury, A.K. & Steinberger, E., 1970. Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. Journal of Reproduction and Fertility 22, 205-212.

Christian, K.A. & Tracy, C.R., 1981. The effect of the thermal environment on the ability of hatchling Galapagos land iguanas to avoid predation during dispersal. Oecologia, 49, 218- 223.

Clutton-Brock, T. & Godfray, C., 1993. Parental investment. In : Behavioural Ecology : An Evolutionary Approach, 3rd edn (eds Krebs, J.R & Davies, N.B.). Blackwell Scientific Publications, Cambridge, 234-262.

Cohet, Y., 1973. Stérilité mâle provoquée par une basse température de développement chez *Drosophila melanogaster*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, 276, 3343-3345.

Corley, J.C., 1999. Host density signal in relation to aggregation in the parasitoid *Venturia canescens*. Netherlands Journal of Zoology,49 (2), 97-109.

Cowley, J.M., Chadfield, K.D. & Baker, R.T., 1992. Evaluation of dry heat as a postharvest disinfestation treatment for persimmons. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 20, 209-215.

Cui, X., Wan, F., Xie, M. & Liu, T., 2008. Effects of heat shock on survival and reproduction of two whitefly species, *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* biotype B. Journal of Insect Science, 8, 1-10.

Dahlhoff, E.P., Fearnley, S.L., Bruce, D.A., Gibbs, A.G., Stoneking, R., McMillan, D.M., Deiner, K., Smiley, J.T. & Rank, N.E., 2008. Effects of temperature on physiology and reproductive success of a montane leaf beetle: implications for persistence of native populations enduring climate change. Physiological and Biochemical Zoology, 81, 718-732.

Dallaire, R., Labrecque, A., Marcotte, M., Bauce, E. & Delisle, J., 2004. The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 112, 169-181.

Damiens, D., 2001. Caractérisation du stock de spermatozoïdes et stratégies de reproduction chez deux hyménoptères parasitoïdes de bruches. Thèse de Doctorat, 169 pages. Université de Tours, France.

Damiens, D., Imbert, E., Bressac, C., Thibeaudeau, C. & Chevrier, C., 2001. Egg-laying, pre-imaginal growth dynamic and mortality in *Eupelmus orientalis* and *Dinarmus basalis*, two solitary ectoparasitoids of *Callosobruchus maculatus*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 99, 97-105.

Damiens, D., Bressac, C., Brillard, J.P. & Chevrier, C., 2002. Qualitative aspects of sperm stock in males and females from *Eupelmus orientalis* and *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Chalcidoidea) as revealed by dual fluorescence. Physiological Entomology. 27:97-102.

Damiens, D., Bressac, C. & Chevrier, C., 2003. The effect of age on sperm stock and egg laying in the parasitoid wasp, *Dinarmus basalis*. Journal of Insect Science. 3:22 (5pp).

Danneels, E.L., Rivers, D.B. & De Graaf, D.C., 2010. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: Recent discovery of an untapped pharmacopee. Toxins 2, 494–516.

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.

David, J.R., Arens, M.F. & Cohet, Y., 1971. Stérilité mâle à haute température chez *Drosophila melanogaster*: nature, progressivite et réversibilité des effets de la chaleur. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris, 272, 1007-1010.

David, J.R., Araripe, L.O., Chakir, M., Legout, H., Lemos, B., Pétavy, G., Rohmer, C., Joly, D. & Moreteau, B., 2005. Male sterility at extreme temperatures: a significant but neglected phenomenon for understanding Drosophila climatic adaptations. Journal of Evolutionary Biology, 18, 838-846.

Davies, L., Williams, D.R., Aguiar-Santana, I.A., Pedersen, J., Turner, P.C. & Rees, H.H., 2006. Expression and down-regulation of cytochrome P450 genes of CYP4 family by

ecdysteroid agonists in *Spodoptera littoralis* and *Drosophila melanogaster*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36(10), 801-807.

Dawson, W.R., 1975. On the physiological significance of the preferred temperatures of reptiles. Perspectives in Biophysical Ecology. D.M. Gates and R Schmerl Editions. 443-473.

DeBach, P. & Smith, H.S., 1941. The effect of host density on the rate of reproduction of entomophagous parasites. Journal of Economic Entomology, 34, 741-745.

Denlinger, D.L., Joplin, K.H., Chen, C.P. & Lee, R.E., 1991. Cold shock and heat shock, in: Lee, R.E., Denlinger, D.L. (Eds), Insects at Low temperature. Chapman and Hall, New York, pp. 131-148.

Denlinger, D.L. & Lee, R.E., 1998. Physiology of cold sensitivity. In: Lethal Temperatures in Integrated Pest Management (ed. Hallman, G.J. & Denlinger, D.L.), Westview Press, Boulder, 55-95.

Denlinger, D.L. & Yocum, G.D., 1998. Physiology of heat sensitivity, in: Hallman, G.J., Denlinger, D.L. (Eds), Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management., Westview Press, Boulder, CO, 7-54.

Delobel, A., 1989. *Uscana caryedoni* (Hym., Trichogrammatidae) Possibilites d'utilisation en lutte biologique contre la bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Col., Bruchidae). Entomophaga, 34 (3), 351-363.

Demeure, G., 1985. Analyse de quelques facteurs liés à la plante hôte *Vigna unguiculata* (Walp.) influençant la reproduction et le développement de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) Coleoptère Bruchidae. Thèse de doctorat, 97 pages. Université François Rabelais. France.

Desjardins, C. A., Perfectti, F., Bartos, J. D., Enders, L. S. & Werren, J. H., 2010. The genetic basis of interspecies host preference differences in the model parasitoid Nasonia. Heredity, 104, 270-277.

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C. & Martin, P.R., 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 105, 6668-6672.

Dixon, A.F.DG., Honek, A., Keil, P., Kotela, M.A.A., Sizling, A.L. & Jarosik, V., 2009. Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for the development in insects. Function Ecology, 23, 257-264.

Do Thi Khanh Hong, 2005. *Anisopteromalus calandrae* : un modèle pour l'étude du succès reproducteur des mâles. Thèse de doctorat, 152 pages. Université François Rabelais. 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.

Dombrovsky, Y. & Perrin, N., 1994. On adaptive search and optimal stopping in sequential mate choice. American Naturalist 144 (2), 355-361.

Donaldson, J. S. & Walter, G. H., 1984. Sex ratios of *Splangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae), in relation to current theory. Ecological Entomology, 4, 307-716.

Dubuffet, A., 2006. Variation intra spécifique de résistance et de virulence dans un système hôte - parasitoïde: Approche intégrative de la spécificité des interactions. Thèse de doctorat, 312 pages. Université François Rabelais. France.

Eckert, R., Randall, D., Burggren, W.W., French, K., Math, F.O., Propper, A. & Henquell, L., 1999. " Acquisition de l'énergie : nutrition, digestion et métabolisme". In Physiologie Animale: mécanismes et adaptations. Paris; Bruxelles: De Boech Université, 627-664.

Eggleton, P. & Gaston, K.J., 1990. "Parasitoid" species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises? Oikos, 59, 417-421.

Enium, S. & Fleming, I.A., 2000. Highly fecund mothers sacrifice offspring survival to maximize fitness. Nature, 450, 565-567.

Ellers J., Driessen G. & Sevenster J.G., 2000. The shape of yhe trade-off betwenn egg production and life span in the parasitoid *Asobara tabida*. Netherlands Journal of Zoology, 50, 29-36.

Ellers, J. & Jervis, M., 2003. Body size and the timing of egg production in paratitoid wasps. Oikos, 102, 164-172.

Esperk, T., Tammaru, T. & Nylin, S., 2007. Intraspecific variability in number of larval instars in insects. Journal of Economic Entomology, 100 (3), 627-645.

Fasolo, A.G. & Krebs, R.A., 2004. A comparison of behavioural change in Drosophila during exposure to thermal stress, Biological Journal of the Linnean Society, 83, 197-205.

Feener Jr, D.H. & Brown B.V., 1997. Diptera as parasitoids. Annual Review of Entomology, 42, 73-97.

Fields, P.G., 1992. The control of stored-product insects and mites with extreme temperature. Journal of Stored Products Research , 28 (2), 89-118.

Fleurat-Lessard, F. & Le Torc'h, J.M., 2001. Control of insects in post-harvest : high temperature and inert atmospheres. In Physical Control Methods in Plant Protection, ed. C Vincent, B Panneton, F Fleurat-Lessard pp. 74-94. Berlin: Springer-Verlag/Paris: INRA, 329 p.

Foerster, L.A., Doetzer, A.K. & de Castro, L.C.F., 2004. Emergence, longevity and fecundity of *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* after cold storage in the pupal stage. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 39, 841-845.

Fox, C.W., 1993. Multiple mating, lifetime fecundity and female mortality of the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Functional Ecology, 7, 203-208.

Fox, C.W., 1993. The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Oecologia, 96, 139-146.

Fox, C.W., 1994. The influence of egg size on offspring performance in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. Oikos, 71, 321-325.

Fox, C.W. & Mousseau, T.A., 1996. Larval host plant affects fitness consequences of egg size variation in the seed beetle *Stator limbatus*. Oecologia, 107, 541-548.

Franks, F., 1995. Protein destabilization at low temperatures. Advances in Protein Chemistry, 46:105–139.

Fry, F.E.J., 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. Environmental Relations and Behavior. W.S. Hoar and D.J. Randall Editions. Fish physiology, 6, 79-134.

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

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., Monge, J.P. & Huignard, J., 1997. Sex-allocation behaviour of a solitary ectoparasitoid : effects of host-patch characteristics and female density. Entomologia Experimentalis et Applicata, 82, 167-174.

Gauthier, N. & Monge, J.P., 1999. Behavioural and physiological responses to conflicting egg-laying stimuli in *Dinarmus basalis*, a synovigenic parasitoid. Physiological Entomology, 24, 303-310.

Gierke, E.von, 1932. Über die Hautungen und die Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven der Mehlmotte *Ephestia kuhniella* Zeller. Roux's Arch. 127, 387-410

Giojalas, L.C. & Catala, S., 1993. Changes in male *Triatoma infestans* reproductive efficiency caused by a suboptimal temperature. Journal of Insect Physiology, 39, 297-302.

Girish, G.K., 1965. Effect of temperature on the development of stored grain insect pests. Bulletin of Grain Technology, 3, 143-154.

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

Gilles R., 2006. Physiologie animale. Bruxelles: De Boeck. 675 p.

Godfray, H.C.J., 1986. Models for clutch size and sex ratio with sibling interaction. Theoretical Population Biology 30, 215-31.

Godfray, H.C.J., 1987. The evolution of clutch size in parasitic wasps. American Naturalist 129, 221-233.

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

Gonen, M., 1977. Survival and reproduction of heat- acclimated *Sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae) at moderately high temperatures. Entomologia Experimentalis et Applicata, 21, 249-253.

Gösswald, K. & Bier, K., 1955. Beeinflussung der Geschlechtsverhaltnisse durch Temperatureinwirkung bei Formica rufa L., Naturwissenschaften, 42, 133-134.

Green, R.F., 1982. Optimal foraging and sex ratio in parasitic wasps. Journal of Theoretical Biology, 95, 43-48.

Grossman, E.F., 1931*:* Heat treatment for controlling the insect pests of stored corn. University of florida Agricultural Experiment Station Bulletin 239, 1-24.

Grout, B.W.W. & Morris, G.J., 1987. The Effects of Low Temperature on Biological Systems. London: Edward Arnold.

Gueye, M., 1982. *Vigna unguiculata* en sambiose avec Rhizobium et Glomus mosseae. Thèse de Doctorat, 150 pages. Université Claude Bernard (Lyon I), France.

Hance, T., Van Baaren, J., Vernon, P. & Boivin, G., 2007. Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. Annual Review of Entomology, 52, 107-126.

Hanks, L.M., Gould, J.R., Paine, T.D. & Millar, J.G., 1995. Biology and host relations of *Avetianella longoi*, an egg parasitoid of the eucalyptus longhorned borer. Annals of the Entomo- logical Society of America 88: 666-671.

Hansen, J.D., 1992. Heating curve models of quarantine treatments against insect pests. Journal of Economic Entomology, 85, 1846-1854.

Hansson, B.S. & Anton, S., 2000. Function and morphology of the antennal lobe: new developments. Annual Review of Entomology, 45, 203-231.

Harshman, L.G. & Zera, A.J., 2007. The cost of reproduction: the devil is in the details. Trends in Ecology and Evolution, 22, 80-86.

He, X.Z., Teulon, D.A.J. & Wang, Q., 2006. Oviposition strategy of *Aphidus ervi* (Hymenoptera : Aphididae) in response to host density. New Zealand Plant Protection, 59, 190-194.

Heinrich, B., 1981. Ecological and evolutionary perspectives. In: Heinrich, B. (Ed.), Insect Thermoregulation. Wiley, New York, 236-302.

Hertz, P.E., Huey, R.B. & Nevo, E., 1982. Fight *vs* flight: body temperature influences defensive responses of lizards. Animal Behavior, 30, 676-679.

Hochachka, P. & Somero, G., 2002. Biochemical Adaptation, Mechanism And Physiological Evolution. New York: Oxford University Press.

Hoffmann, M.P., Ode, P.R., Walker, D.L., Gardner, J., Saskya van Nouhuys, & Shelton, A.M., 2001. Performance of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Reared on Factitious Hosts, Including the Target Host, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Biological Control, 21, 1-10.

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.

Hogge, M.A.F. & King, P.E., 1975. The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal Submicroscopic Cytol ogy, 7, 81-96.

Houseman, J.G. & Downe, A.E.R., 1981. Identification and partial characterization of digestive proteinases from *Triatoma phyllosoma pallidipennis* Stal (Hemiptera: Reduviidae). Comparative Biochemistry and Physiology, 70B, 713-717.

Howe, R.W., 1957. A laboratory study of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (F.) (Col., Anobiidae) with a critical review of the literature on its biology. Bulletin Entomological Research 48, 9-56.

Huang, L.H., Chen, B. & Kang, L., 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and HSp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. Journal of Insect Physiology, 53, 1199-1205.

Huey, R.B. & Hertz, P.E., 1984. Is a-jack-of-all temperatures a master of none? Evolution, 38, 441- 444.

Huey, R.B. & Stevenson, R.D., 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: discussion of approaches. American Zoology, 19, 357-366.

Huey, R.B., 1982. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. C. Gans and F. H. Pough Editions. Biology of the reptilia, 12, 25-91.

Huignard, J., 1985. Importance des pertes dûes aux insectes ravageurs des graines : problèmes posés par la conservation des légumineuses alimentaires, source de protéines végétales. Cahiers de nutrition et de Diététique, 20, 193-199.

Hutchinson, L.A. & Bale, J.S., 1994. Effects of sublethal cold stress on the aphid *Rhopalosiphum padi*. Journal of Applied Ecology, 31, 102-108.

IPCC, 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Summary for Policy Makers. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Isitan, O.V., Gunduz, E.A. & Gulel, A., 2011. Effect of host density on some biological characteristics and glycogen, total sugar and lipid levels of parasitoid *Bracon hebetor* Say, 1836 (Hymenoptera: Braconidae).Türkish Entomoloji Dernegi and Dergisi, 35, 195-206.

Islam, W., 1993. The biology of *Anisopteromalus calandrae* How. - Ectoparasitoid on *Callosobruchus chinensis* L. Bangladesh Journal of Zoology, 21, 123-132.

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, 72-76.

Issartel, J., 2002. Adaptations de la faune souterraine aux basses tempérautres : mécanismes et enjeux écologiques. Thèse de Doctorat, 175 pages. Université Claude Bernard - Lyon 1. France.

Iwasa, Y., Suzuki, Y. & Matsuda, H., 1984. Theory of oviposition strategy of parasitoids. I. Effect of mortality and limited egg number. Theoretical Population Biology, 26, 205-227.

Jacob, S., Boivin, G., 2004. Costs and benefits of polyandry in the egg parasitoid *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Biological Control, 32, 311-318.

Jalali, M.A., Tirry, L., Arbab, A. & De Clercq, P., 2010. Temperature-dependent development of the two-spotted ladybeetle, *Adalia bipunctata*, on the green peach aphid, Myzus persicae, and a factitious food under constant temperature. Journal of Insect Science 10, article 124.

James, S.S., Pereira, R.M., Vail, K.M. & Ownley, B.H., 2002. Survival of imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) species subjected to freezing and near-freezing temperatures. Environmental Entomology, 31 (1), 127-133.

Janowitz, S.A. & Fischer, K., 2011. Opposing effects of heat stress on male versus female reproductive success in *Bicyclus anynana* butterflies. Journal of Thermal Biology, 36, 283-287.

Jarosik, V. & Honek, A., 2007: Sexual differences in insect development time in relation to sexual size dimorphism. In: Fairbairn D., Blanckenhorn W., Szekely T. (Eds.). Sex, Size and Gender Roles. Oxford University Press, Oxford, 205-211

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

Johnson, J.A., Valero, K.A. & Hannel, M.M., 1997. Effect of low température storage on survival and reproduction of Indianmeal moth (Lepidotera: Pyralidae). Crop protection, 16 (6), 519-523.

Jones, W.T., 1982. Sex ratio and host size in a parasitoid wasp. Behavioral Ecology and Sociobiology, 10, 207-210.

Jones, S.R. & Kunz, S.E., 1998. Effects of cold stress on survival and reproduction of *Haematobia irritants* (Diptera : Muscidae). Journal of Medical Entomology, 35, 725-731.

Joplin, K.H., Yocum, G.D. & Denlinger, D.L., 1990. Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. Journal of Insect Physiology, 36: 825-834.

Jørgensen, K.T., Sørensen, J.G. & Bundgaard, J., 2006. Heat tolerance and the effect of mild heat stress on reproductive characters in *Drosophila buzzatii* males. Journal of Thermal Biology, 31, 280-286.

Kandeel, F.R. & Swerdloff, R.S., 1988. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. Fertil Steril 49, 1-23.

Kerr, R., 2004. Three degrees of consensus. Science 305, 932-934.

King, B. H., 1987. Offspring sex ratios in parasitoid wasps. The Quarterly Review of Biology, 62 (4), 367-396.

King, B.H., 1993. Sex ratio manipulation by parasitoid wasps. In: Wrensch, D.L. & Ebbert, M. (eds). Evolution and Diversity of sex ratio in insects and mites. Chapman and Hall, New York, London. 418-441.

King, B.H. & Lee, H.E., 1994. Test of the adaptiveness of sex ratio manipulation in a parasitoid wasp. Behavioral Ecology and Sociobiology, 35, 437-443.

Kobayashi, A. & Shimada, M., 2000. Field sex ratio of a Braconid parasitoid wasp, *Heterospilus prosopidis* (Hymenoptera: Braconidae), in the southwestern United States: Concordance with host-quality model. Annals of the Entomological Society of America, 93 (4), 819-823.

Koehn, R.K. & Bayne, B.L., 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. Biological Journal of the Linnean Society, 37 (1-2), 157-171.

Kostal, V., Yanagimoto, M. & Bastl, J., 2006. Chill-injury and disturbance of ion homeostasis in the coxal muscle of the tropical cockroach (*Nauphoeta cinerea*). Comparative Biochemistry and Physiology B, 143, 171-179.

Krebs, R.A. & Loeschcke, V., 1994. Effects of exposure to short-term heat-stress on fitness components in *Drosophila melanogaster*. Journal of Evolutionary Biology, 7, 39-49.

Labarussias, M., 2005. Etude des stratégies de ponte d'*Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera : Pteromalidae) dans différentes conditions environnementales. Mémoire de DEA, 18 pages. Université de Tours, France.

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.

Lacoume, S., Bressac, C. & Chevrier, C., 2007. Sperm production and mating potential of males after a cold shock on pupae of the parasitoid wasp *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal of Insect Physiology, 53, 1008-1015.

Lacoume, S., 2007. Développement et succès reproducteur des males parasitoides, *Dinarmus basalis*, suite à des contraintes environnementales. Thèse de Doctorat 169 pages. Université de Tours, France.

Lacoume S., Bressac C. & Chevrier C., 2009. Male hypofertility induced by Paraquat consumption in the non-target parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). Biological control 49, 214-218.

Laugé, G., 1985. Sex determination: genetic and epigenetic factors, In G. A. Kerkut & L. I. Gilbert, eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology,1, 295-318. Pergamon, Oxford.

Laugé, G. & Masner, P., 1974. Incidences de température élevées appliquées au cours du stade pupal sur les potentialités reproductrices des adultes de *Drosophila melanogaster.* Entomologia Experimentalis et Applicata, 17 (4), 511-521.

Lauzière, I., 1999. Stratégies reproductives chez *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethylidae), parasitoïde du scolyte des grains du caféier, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Thèse de Doctorat 364 pages. Université Laval, Canada.

Lécureuil, C., Rougiere, N., Nguyen, T.M., Bressac, C. & Chevrier, C., 2012. Les hymenoptères parasitoides : des modèles pour l'étude de l'hypofertilité male. Médecine/Science 28 : 76-81.

Lebreton, S., 2009. Stratégies de ponte en situations de compétition chez une guepe parasitoide. Thèse de Doctorat 143 pages. Université de Tours, France.

Lebreton, S., Chevrier, C. & Darrouzet, E., 2010. Sex allocation strategies in response to conspecifics offsprings sex ratio in solitary parasitoids. Behavioral Ecology, 21 (1),107-112.

Lee, R. E. & Delinger, D. L., 1991. Insects at low temperature..Eds Chapman and Hall, New York.

Lee, R.E., Costanzo, J.P. & Mugnano, J.A., 1996. Regulation of supercooling and ice nucleation in insects. European Journal of Entomology 93: 405-418.

Legner, E.F., 1967. Behavior changes the reproduction of *Spalangia cameroni*, *S. endius*, *Muscidifurax raptor* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) at increasing fly host densities. Annals of the Entomological Society of America, 60, 819-826.

Lelièvre, H., 2010. Stratégies de thermorégulation chez deux colubridés sympatriques: la couleuvre verte et jaune *Hierophis viridiflavus* et la couleuvre d'esculape *Zamenis longissimus*. Une approche intégrée de la phisiologie à la démographie. Thèse de Doctorat 227 pages, Université de Poitiers, France.

Levins, R., 1968. Evolution in changing environments: Some theoretical explorations Princeton University Press, Princeton.

Lhoste, J. & Normand, M.L., 1987. La lutte contre les insectes nuisibles à l'agriculture et son influence sur l'environnement. Les Cahiers de Liaison de l' O.P.I.E., 21 (3), 39-41.

Liu, S.S., Zhang, G.M. & Zhu, J., 1995. Influence of temperature variations on rate of development in insects: Analysis of case studies from emtomological literature. Annals of the entomological society of America, 88, 107-119.

Liu, X. & Hui, Y., 2009. Effect of temperature on development and survival of *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae). Scientific Research and Essay, 4, 467-472.

Ma, S., Hau, B. & Poehling, H.M., 2003. Effects of pattern and timing of high temperature exposure on reproduction of the rose grain aphid, *Metopolophium dirhodum*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 110, 65-71.

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

Mahroof, R., Bh. Subramanyam, J.E. & Flinn, P., 2005a. Reproductive performance of *Tribolium castaneum* (Coleopera: Tenebrionidae) exposed to the minimum heat temperature as pupae and adults. Journal of Economic Entomology, 98, 626-633.

Mahroof, R.,Zhu, K.Y. & Bh. Subramanyam, J.E., 2005b. Changes in expression of heat shock proteins in *Tribolium castaneum* (Coleopera: Tenebrionidae) in relation to developmental stage, exposure time, and temperature. Annals of Entomological Society of America, 98, 100-107.

Manon, A., Flinn, P.W. & Dover, B.A., 2002. Influence of temperature on the functional response of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Stored Products Research, 38, 463-469.

Mantel, N., 1966. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising its consideration. Cancer Chemotherapy Reports, 50, 163-170.

Markow, T.A. & Toolson, E.C., 1990. Temperature effects on epicutilar hydrocarbons and sexual isolation in *Drosophila mojavensis*. In Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila (ed. Barker, J.S.F., Starmer, W.T. and MacIntyre). Newyork : Plenum Press. 315-331.

Mazalov, V., Perrin, N. & Dombrovsky, Y., 1996. Adaptive search and information updting in sequential mate choice. American Naturalist 148 (1), 123-137.

McCarty J.P., 2001 - Ecological consequences of recent climate change - Conservation Biology, 15: 320 -331.

McDonald, J., Bale, J.S. & Walters, K.F.A., 1999. Temperature, development and establishment potential of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) in the United Kingdom. European Journal of Entomology, 96, 169-173.

McWhorter, R. E., Grant, J.F. & Shepard, M., 1984. Life history of a predator, Calleida decora, and the influence of temperature on development. Journal of Agricultural Entomology, 1 (1), 68-77.

Medeiros, R.S., Ramalho, F.S., Zanuncio, J. C. & Serrão, J.E., 2003. Effect of temperature on life table parameters of *Podisus nigrispinus* (Het., Pentatomidae) fed with *Alabama argillacea* (Lep., Noctuidae) larvae. Journal of Applied Entomology, 127 (4), 209–213.

Messina, F.J., 1993. Heritability and evolvability of fitness components in *Callosobruchus maculatus*. Heredity, 71, 623-629.

Michaud, S., Marin, R., Westwood, J.T. & Tanguay, R.M., 1997. Cell-specific expression and heat-shock induction of Hsps during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Journal of Cell Science, 110, 1989-1997.

Minko, D.O., 2009. Influence des facteurs écologiques (température et hygrométrie) sur le développement de la cochenille farineuse du manioc (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, Homoptera: Pseudococcidae). Tropicultura 27, 21-25.

Mironidis, G.K. & Savopoulou-Soultani, M., 2010. Effects of heat shock on survival and reproduction *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) adults. Journal of Thermal Biology, 35, 59-69.

Mironidis, G.K, Stamopoulos, D.C. & Savopoulou-Soultani, M., 2010. Overwintering survival and spring emergence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Northern Greece. Environmental Entomology, 39(4), 1068-1084.

Mitchell, H.K. & Lipps, L.S., 1978. Heat shock and phenocopy induction in Drosophila. Cell, 15, 907-918.

Miya, K. & Kobayashi, Y., 1974. The embryonic development of *Atrachya menetriesi* Faldermann (Coleoptera, Chrysomelidae). II. Analysis of early development ligation and low temperature treatment. Journal of Faculty of Agricuture, Iwate University 12, 39-55.

Ngamo, T.S.L., Kouninki, H., Ladang, Y.D., Ngassoum, M.B., Mapongmestsem, P.M. & Hance, T., 2007. Potential of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) as biocontrol agent of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleopetera: Bruchidae). African Journal of Agricultural Research, 2 (4), 168-172.

Neven, L.G., 2000. Physiological responses of insects to heat. Postharvest Biology and Technology, 21, 103-111.

Niedermaer, S., Obermaier, E. & Steidle, J.L.M., 2012. Some like it hot, some not: influence of extreme temperatures on *Lariophagus distinguendus* and *Anisopteromalus calandrae*. Journal of Applied Entomology, 1-7.

Nguyen, T.M., Bressac, C. & Chevrier, C., 2013. Heat stress affects male reproduction in a parasitoid wasp. Journal of Insect Physiology, 59, 248-254.

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.

Pandey, R.K. & Westphal, E., 1989. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.In: van der Maesen, L.J.G. & Somaatmadja, S. (Editors). Plant Resources of South-East Asia No. 1: Pulses. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, 77-81

Park, T., 1954. Experimental studies of interspecific competition. Temperature, humidity and competition in two species of Tribolium. Physiological Zoology, 27, 117-238.

Pereira, R.M., Koehler, P.G., Pfiester, M. & Walker, W., 2009. Lethal effects of heat and use of localized heat treatment for control of bed bug infestations. Journal of Economic Entomology. 102, 1182-1188.

Perrin, N. & Sibly, R.M., 1993. Dynamic models of energy allocation and invesment. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 24, 379-410.

Phillips, T., Baker, J. & Maegdan, B., 2003. Biological control of stored-product pests. In: IPM of Alaska.

Planello, R., Martinez-Guitarte, J.L. & Morcillo, G., 2008. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. Chemosphere, 71, 1870-1876.

Powell, T.E., 1931. An ecological study of the tobacco beetle, *Lasioderma serricorne* Fabr., with special references to its life history and control. Ecological Monographs 1, 333-393.

Proverbs, M.D. & Newton, J.R., 1962. Effect of heat on the fertility of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae). Canadian Entomology, 94, 225–233.

Quicke D. L. J., 1997. Parasitic wasps. Chapman et Hall, London.

Ramløv, H., 2000. Aspects of cold tolerance in ectothermic animals. Human Reproduction, 15, 26-46.

Ranjith A. M., 2007. An inexpensive olfactometer and wind tunnel for *Trichogramma chilonis* Ishii (Trichogrammatidae: Hymenoptera) Journal of Tropical Agriculture, 45 (1-2), 63-65.

Renault, D., Salin, C., Vannier, G. & Vernon, P., 1999. Survival and chill-coma in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), exposed to low temperatures. Journal of Thermal Biology, 24, 229-236.

Rinehart, J.P., Yocum, G.D. & Denlinger, D.L., 2000. Thermotolerance and rapid cold hardening ameliorate the negative effects of brief exposures to high or low temperatures on fecundity in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. Physiological Entomology, 25, 330-336.

Robert, S.P., Marden, J.H. & Feder, M.E., 2003. Dropping like flies: environmentally induced impairment and protection of locomotor performance in adult *Drosophila melanogaster*. Physiological and Biochemical Zoology, 76, 615-621.

Rockett, J.C., Mapp, F.L., Garges, J.B., Luft, J.C., Mori, C. & Dix, D.J., 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. Biology of Reproduction. 65, 229-239.

Roff, D.A., 2002. Life history evolution. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA. 527pp.

Rohmer, C., David, J.R., Moreteau, B. & Joly, D., 2004. Heat induced male sterility in *Drosophila melanogaster* : adaptative genetic variations among geographic populations and role of the Y chromosome. The Journal of Experimental Biology, 207, 2735-2743.

Roux, C., Le Lann, J.J.M., Van Alphen, J. & Van Baaren, J., 2010. How does heat shock affect the life history traits of adults and progeny of the aphid parasitoid *Aphidius avenae* (Hymenoptera : Aphidiidae) ? Bulletin of Entomological Research, 100, 543-549.

Roy, M., Brodeur, J. & Cloutier, C., 2002. Relationship between temperature and development rate of *Stethorus punctillum* (Coleoptera: Coccinellidae) and its prey *Tetranychus mcdanieli* (Acarina: Tetranychidae). Environmental Entomology, 31, 177-187.

Runner, G.A., 1919. The Tobacco Beetle: an important pest in tobacco products. Bulletin of the United States Department of Agriculture No. 737, 49-51.

Rust, M.K. & Reierson, D.A., 1998. Use of extreme temperatures in urban insect pest management. In Hallman, G.J. and Denlinger, D.L., eds, Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management. Boulder, Colorado: Westview Press, 201-234.

Sagarra, L.A., Vincent C., Peters N.F. & Stewart R.K., 2000. Effect of host density, temperature, and photoperiod on the fitness of Anagyrus kamali, a parasitoid of the hibiscus mealybug *Maconellicoccus hirsutus*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 96, 141-147.

Sala, O.E., Chapin F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H., 2000. Biodiversity: global biodiversity scenarios for the year 2100. Science 287: 1770-1774.

Sarup, P., Dahlgaard, J., Norup, A.M., Jørgensen, K.T., Hebsgaard, M.B. & Loeschcke, V., 2004. Down regulation of Hsp 70 expression level prolongs the duration of heat-induced male sterility in *Drosophila buzzatii*. Functional Ecology, 18, 365-370.

Saxena, B.P, Sharma, P.R., Thappa, R.K. & Tikku, K., 1992. Temperature induced sterilization for control of three stored grain beetles. Journal of Stored Products Research, 28, 67-70.

Schiffers, B. & Wainwright, H., 2011. Lutte biologique et protection intégrée. COLEACP.

Scott, M., Berringan, D. & Hoffmann, A.A., 1997. Costs and benefits of acclimatation to elevated temperature in *Trichogramma carverae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 85, 211-219.

Sehnal, F.,1991. Effects of cold on morphogenesis, In Lee, R.E. and Denlinger, D.L. eds., Insects at low temperature. Chapman and Hall, Newyork, 149-173.

Sembène, M., Gueye, M.T., Delobel, P., Sall, A. & Delobel, A., 2006. Des insectisation of stored groundnut infested by *Caryedon serratus* (Ol.): utilisation of solarization in the Sahelian area. Journal des Sciences, 6 (1), 1-11.

Siekmann, G., Keller, M.A. & Tenhumberg, B., 2004. The sweet tooth of adult parasitoid *Cotesia rubecula*: ignoring hosts for nectar? Journal of Insect Behavior, 17, 459–476.

Sinclair, B.J., Vernon, P., Klok, C.J. & Chown, S.L., 2003. Insects at low temperatures: an ecological perspective. TRENDS in Ecology and Evolution, 18, 257-262.

Sinervo, B. & Licht, P., 1991. Proximate constraint on the evolution of egg size, egg number, and total clutch mass in lizards. Science, 252, 1300-1302.

Smith, C.C. & Fretwell, S.D., 1974. The optimal balance between size and number of offspring. American Naturalist, 108, 499-506.

Smith, L., 1992. Effect of temperature on life history characteristics of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitizing maize weevil larvae in corn kernels. Environmental Entomology 21, 877-887.

Smith, L., 1993[1]. Effect of humidity on life history characteristics of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitizing maize weevil (Coleoptera: Curculionidae) larvae in shelled corn. Environmental Entomology 22, 618-624.

Smith, L., 1993. Host-size preference of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hym.: Pteromalidae) on *Sitophilus zeamais* (Col.: Curculionidae) larvae with uniform age distribution. Entomophaga, 38 (2), 225-233.

Smith L., Weaver, D.K. & Arbogast R.T., 1995. Suitability of the maize weevil and angoumois grain moth as hosts for the parasitoids *Anisopteromalus calandrae* and *Pteromalus cerealellae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 76, 171-177.

Snook, R.R., Cleland, S.Y., Wolfner, M.F. & Karr, T.L., 2000. Offsetting effects of Wolbachia infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: Analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. Genetics, 155, 167-178.

Sømme, L., 1999. The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. European Journal of Entomology, 96, 1-10.

Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. & Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecology Letters, 6, 1025-1037.

Stacey, D.A. & Fellowes, M.D.E., 2002. Temperature and the development rates of thrips evidence for constraint on local adaptation? European Journal of Entomology, 99, 399-404.

Strand, M.R., 1988. Variable sex ratio strategy of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae): adaptation to host and conspecific density. Oecologia, 77, 219-224.

Suasa-ard, W., 2010. Natural enemies of important insect pests of field crops and utilization as biological control agents in Thailand. Proceedings of International Seminar on Enhancement of Functional Biodiversity Relevant to Sustainable Food Production in ASPAC. Japan.

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.

Tang J., Mitcham, E., Wang, S. & Lurie, S., 2007. Heat treatments for postharvest pest control: theory and practice. CABI Pub., Wallingford, Oxfordshire, UK.

Tauber, M.J., Tauber, C.A. & Gardescu, S., 1993. Prolonged storage of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environmental Entomology 22, 843-848.

Taylor, A. D., 1988. Host effects on functional and ovipositional responses of *Bracon hebetor*. The Journal of Animal Ecology, 57 (1), 173-184.

Tillman, P. G. & Cate, J. R., 1993. Effect of host size on adult size and sex ratio of *Bracon mellitor* (Hymenoptera: Braconidae). Environmental Entomology, 22 (5), 1161-1165.

Thomas, M.B. & Blanford, S., 2003. Thermal biology in insect-pathogen interactions. Trends in Ecology and Evolution 18, 344-350.

Thompson, J. N., & Pellmyr, O., 1991. Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. Annual Review of Entomology, 36, 65-89.

Tramontano, F., Malanga, M., Farina, B., Jones, R. & Quesada, P., 2000. Heat stress reduces poly(ADPR)polymerase expression in rat testis. Molecular Human Reproduction 6, 575-581.

Ueno, T., 1999. Host-size-dependent sex ratio in a parasitoid wasp. Researches on Population Ecology 41, 47-57.

Ulmer B.J., Jacas J.A., Pena J.E., Duncan R.E. & Castillo J., 2006. Effect of temperature on life history of *Aprostocetus vaquitarum* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). Biological Control, 39, 19-25.

Van den Assem J., Putters, F.A. & Prins, T.C., 1984. Host quality effects on sex ratio of the parasitic wasp *Anisopteromalus calandrae* (Chalcidoidea, Pteromalidae). Netherlands Journal of Zoology, 34, 33-62.

Vannier, G., 1994. The thermobiological limits of some freezing tolerant insects: the supercooling and thermostupor points. Acta Oecologica, 15, 31-42.

Verhulst, E.C., Beukeboom, L.W. & van de Zande, L., 2010. Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. Science, 328, 620-623.

Waage, J.K., 1979. Foraging for patchily-distributed hosts by the parasitoid, *Nemeritus canescens*. Journal of Animal Ecology, 48, 353-371.

Waage, J. K., 1982. Sibmating and sex ratio strategies in scelionid wasps. Ecological Entomology, 7, 103-112.

Waage, J. K., 1986. Family planning in parasitoids: adaptive patterns of progeny and sex allocation. In Insect Parasitoids (Waage, J. & Greathead, D. eds). Academic Press, New York, USA, 63-95.

Waage, J.K. & Godfray, H.C.J., 1985. Reproductive strategies and population ecology of insect parasitoids. In Behavioural Ecology: Ecological Consequences of Adaptative Behaviour (Sibly, R.M. & Smith, R.H., eds). Blackwell, Oxford, UK, 449-470.

Waage, J.K. & Lane, J.A., 1984. The reproductive strategy of a parasitic wasp. II. Sex allocation and local mate competition in *Trichogramma evanescens*. Journal of Animal Ecology, 53, 417-26.

Wagner, T.L., Wu, H.I., Sharpe, P.J.H., Schoolfield, R. & Coulson, R.N., 1984. Modelling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. Annals of the Entomological Society of America, 77, 208-225.

Wajnberg E. & Ris, N., 2007. Parasitisme et lutte biologique. In "Ecologie et Evolution des Systèmes Parasités", Thomas F., J.-F. Guégan & F. Renaud (eds.), De Boeck Université, 257-299.

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

Werren, J.H., 1984. A model for sex ratio selection in parasitic wasps: Local mate competition and host quality effects. Netherland Journal of Zoology, 34, 81-96.

Wilmer, P., Stone, G. & Johnston, I., 2000. Environmental physiology of animals. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom. 644 pp.

Wilson, F. & Woolcock, L.T., 1960. Environmental determination of sex in a parthenogenetic parasite. Nature, 186, 99-100.

Winkler, D.W. & Wallin, K., 1987. Offsprings size and number: a litle history model linking effort per offspring and total effort. American Naturalist, 192, 708-720.

Wrensch, D.L., 1993. Evolutionary flexibility through haploid males or how chance favors the prepared genome, In D. L. Wrensch & M. A. Ebbert, eds. Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites, Chapman and Hall, New York, 118-149.

Xie, Q., Hou, B. & Zhand, R., 2008. Thermal responses of oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) late third instars: mortality, puparial morphology, and adult emergence. Journal of Economic Entomology, 101, 736-741.

Yamamoto, C.M., Sinha Hikim, A.P., Huynh, P.N., Shapiro, B., Lue, Y., Salameh, W.A., Wang, C. & Swerdloff, R.S., 2000. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. Biology of Reproduction, 63, 1683-1690.

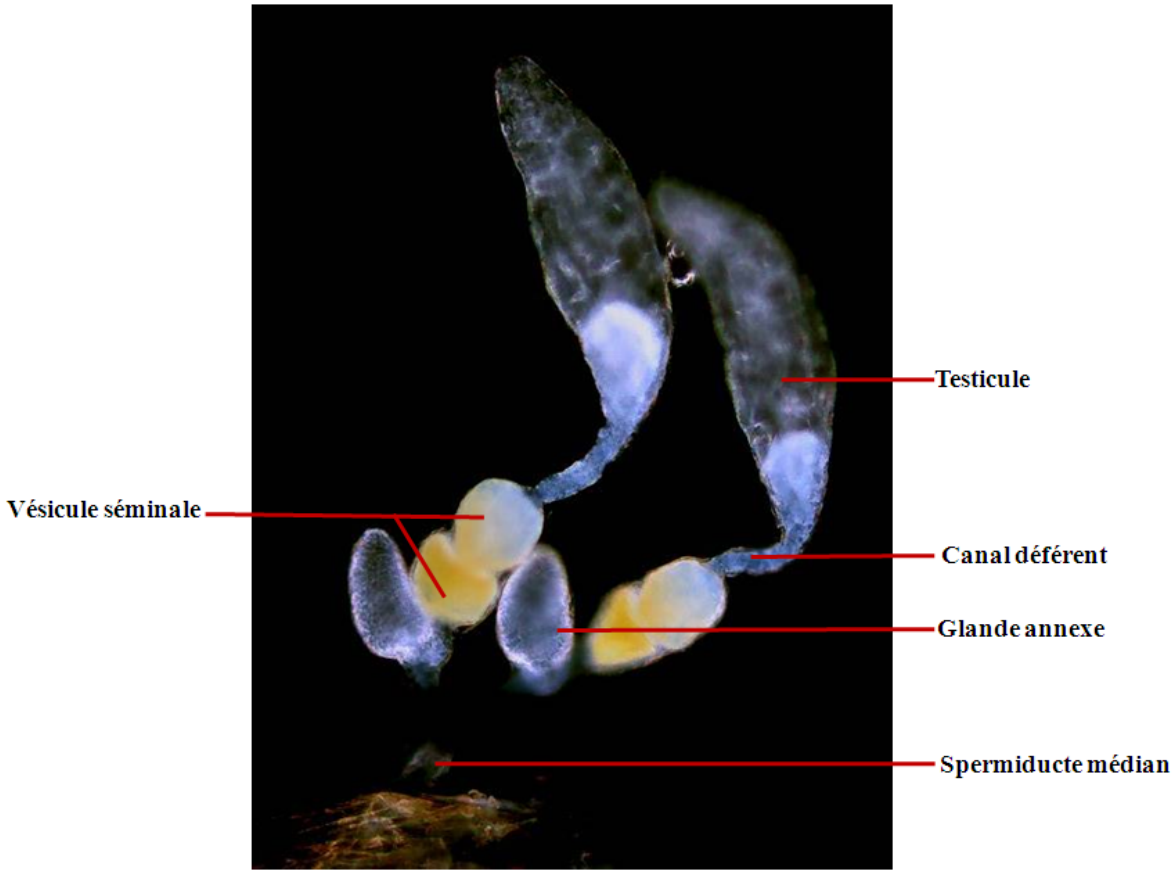
Yocum, G.D., Zdarek, J., Joplin, K.H., Lee, R.E. Jr., Smith, D.C., Manter, K.D. & Denlinger, D.L., 1994. Alteration of the eclosion rhythm and eclosion behaviour in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, by low and high temperature stress. Journal of Insect Physiology, 40, 13-21.

Yu, S.H., Ryoo, M.I., Na, J.H. & Choi, W.I., 2003. Effect of host density on egg dispersion and the sex ratio of progeny of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). Journal of Stored Products Research, 39, 385-393.

Zizzari, Z.V. & Ellers, J., 2011. Effects of exposure to short-term heat stress on male reproductive fitness in a soil arthropod. Journal of Insect Physiology, 57, 421-426.

Annexes

Annexe 1 - Organisation de l'appareil reproducteur mâle d'*A. calandrae* (Bressac, C.)



Thanh Manh NGUYEN

EFFECTS DE CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES (DENSITÉ EN HÔTES, STRESS THERMIQUES) SUR QUELQUES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES MÂLES D'*ANISOPTEROMALUS CALANDRAE*

Résumé

Chez les parasitoïdes, le succès reproducteur n'est pas seulement de permettre une perpétuation de l'espèce il est aussi très important pour la lutte biologique contre les insectes nuisibles. Donc, il est essentiel que la population se développe durablement et produise des descendants fertiles. Au cours de leur vie, à cause de leur petite taille, les parasitoides doivent faire face aux contraintes écologiques (biotiques et abiotiques) qui peuvent agir directement ou indirectement sur l'individu, impliquant des changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux qui, à leur tour, affectent la survie et notamment le succès reproducteur d'individus. L'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre les conséquences des contraintes écologiques sur la reproduction à partir d'un ectoparasitoide *Anisopteromalus calandrae*. Nos résultats montrent que la décision de ponte des femelles parasitoïdes est liée à la densité en hôtes qui affecte à la fois la taille des individus et leur fitness avec comme conséquence une augmentation du nombre de mâles dans la descendance. D'autre part, le stress thermique appliqué soit au stade nymphal ou adulte cause des effets négatifs sur la survie et une diminution du stock de spermatozoïdes est également observée. Les mâles stressés sont également de moins bons compétiteurs. Les causes de la diminution de la production de spermatozoïdes suite à un stress thermique chaud appliqué au stade larvaire ou adulte sont discutées. L'ensemble de nos résultats non seulement confirment que l'effet des contraintes écologiques sur la reproduction des mâles de parasitoïdes est très important (mâles hypofertiles, moins bons compétiteurs…), mais également nous permettent d'émettre des hypothèses sur les modifications de la biodiversité qui pourraient survenir suite à un rechauffement climatique global.

Mots-clés: *Anisopteromalus calandrae*, Male fitness, Parasitoïdes solitaires, Stratégies de ponte, Stress thermique, Choc thermique, Spermatozoïde, Hypofertilité, Sex-ratio, Survie

Abstract

In parasitoids wasps, reproductive success not only perpetuation of the species, it is also a very important factor for biological control against pests, since it is essential that the population grows and sustainably produce fertile offsprings. During their lives, because of their small size, parasitoids face ecological constraints (both biotic and abiotic) that may affect directly or indirectly the individuals, involving changes in their morphology, physiology or behavior, which in turn, affect the survival and reproductive success. The overall objective of this thesis was to better understand the consequences of the ecological constraints on reproduction in the ectoparasitoid wasp Anisopteromalus calandrae. Our results show that the parasitoid females' decision to lay eggs is related to the host density that affects both the offspring's size and fitness, consequently increasing the number of males in the offspring. On the other hand, the thermal stress applied to the pupae or adults had negative effects on survival and decreased the quantity of sperm. Moreover, stressed males are less successful competitors. The causes of the decrease in sperm production after a heat treatment applied to larval or adult are discussed. Our results not only confirm that the effect of environmental constraints on male parasitoids' reproduction is very important (subfertile males, less successful competitors...) but also allow us to speculate on changes in biodiversity that may arise as a result of global climate warming.

Keywords: Anisopteromalus calandrae, Male fitness, Solitary parasitoids, Egg laying strategy, Heat treatment, Sperm, Hypofertility, Sex-ratio, Survival rates.