



Université de Bourgogne
UMR CNRS 6282 Biogéosciences
Équipe Écologie Évolutive

Thèse
Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Caractérisation du rôle du stade non-infectieux du parasite
acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis* dans la manipulation
comportementale de son hôte intermédiaire amphipode

Lucile Dianne

Soutenue publiquement le 06 décembre 2012

Jury

Loïc Bollache, Professeur, Université de Bourgogne	Président
Jacob Koella, Professeur, Université de Neuchâtel (Suisse)	Examineur
Yannick Outreman, Professeur, Agrocampus Ouest, Rennes	Rapporteur
Marie-Jeanne Perrot-Minnot, Maître de conférences, Université de Bourgogne	Directeur
Thierry Rigaud, Directeur de recherches CNRS, Dijon	Directeur
Ana Rivero, Chargée de recherches CNRS, Montpellier	Examineur
Frédéric Thomas, Directeur de recherches CNRS, Montpellier	Rapporteur

Remerciements

Coucher sur le papier des sentiments, anecdotes ou ressentis n'est pas chose facile. Les personnes qui me connaissent savent qu'il en faut beaucoup pour que j'exprime mes impressions ou sentiments, dans le bon comme dans le mauvais sens. Vous aurez deviné, donc, que je ne suis pas des plus à l'aise pour ce genre d'exercice ! Je vais alors essayer de n'oublier personne, et surtout, de traduire mon ressenti le plus fidèlement possible.

Pour commencer, je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, que sont Marie-Jeanne Perrot-Minnot et Thierry Rigaud. Il est évident que sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible. Vous avez été tous les deux des directeurs plus qu'exemplaires, et je ne saurais vous remercier suffisamment pour ce que vous m'avez appris depuis plus de 4 ans.

Marie-Jeanne, tes connaissances des interactions hôtes-parasites, et plus généralement de la biologie évolutive, m'ont toujours captivée, et je te remercie de m'en avoir fait profiter. Merci pour avoir contribué à ma connaissance scientifique et à mon ouverture d'esprit en la matière. Thierry, par où commencer... ?! Je te remercie mille fois pour tout le temps que tu m'as consacré, merci pour toutes les discussions, merci pour tous tes conseils, merci pour ta gentillesse. C'est toi qui m'as donné envie de poursuivre, après le M1, puis après le M2, sur cette thématique passionnante qu'est la manipulation parasitaire. Autant dire que je n'en serais clairement pas là sans toi. Avant de commencer cette thèse, tu m'avais dit que ce que tu attendais de moi, c'était de t'apprendre quelque chose, en quelque sorte de devenir meilleure que toi sur mon sujet ! Au moins, j'aurais essayé ! J'ai fait de mon mieux en tout cas, quelles qu'aient été les circonstances. Encore une fois, merci d'avoir été un si bon encadrant.

Merci également à Karen McCoy et Frédéric Fleury pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Vos conseils avisés m'auront été d'une grande aide pendant cette thèse.

Je remercie Frédéric Thomas et Yannick Outreman pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'Ana Rivero, Jacob Koella et Loïc Bollache pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Merci, enfin, aux stagiaires de M1 et M2 que j'ai encadrés, sans qui ce travail ne serait pas non plus ce qu'il est. Dans l'ordre chronologique, merci donc à Elsa, Mickaël, Alex et Arnaud.

Parce qu'aucune thèse ne peut se réaliser seul, je souhaite remercier également l'ensemble de l'équipe écologie évolutive et du laboratoire Biogéosciences. Tout d'abord, un immense merci à Alouexe, Maria, Christine, Seb et Aude pour leur soutien technique sans faille.

Alouexe, voilà plus de 4 ans que nous travaillons ensemble ! J'espère que ça aura été aussi agréable pour toi que pour moi. Tu ne peux pas imaginer comme ta présence pendant les manip, dans ces salles horriblement froides et humides, m'aura sorti à chaque fois d'une profonde dépression... Tu es le plus chouette collègue de paillasse qu'on puisse faire ! Sans compter bien sûr les nombreux biscuits que tu m'a offerts (si tu essayais de me soudoyer, ça a un peu marché, j'avoue... !), et tes goûts musicaux (quasiment) irréprochables. Ton aide aura été très précieuse, et je t'en remercie, vraiment.

Maria et Christine, merci à toutes les deux pour votre aide ! Bien que vous deviez aider de nombreuses personnes en même temps, sans compter la demi-tonne de stagiaires à chaque printemps, vous étiez toujours là quand j'avais besoin. Et concernant la génétique, on peut dire que j'ai eu besoin d'aide en effet ! Je vous remercie vivement pour tout ça.

Seb et Aude, merci mille fois pour votre disponibilité. Comme pour Maria et Christine, vous devez gérer beaucoup de choses et de monde en même temps. Malgré ça, vous êtes toujours présents, et je vous en remercie. Seb, tu m'auras toujours plus qu'impressionnée par tes talents de McGyver, tu es trop fort ! Avec Thierry, Marie-Jeanne et Alouexe, tu es certainement une personne qui aura été indispensable à l'élaboration de ces travaux de thèse. Je suis consciente que je te dois davantage qu'un simple remerciement.

Merci à Yannick, F-X, Jérôme et Loïc pour l'aide et les conseils que vous n'hésitez jamais à nous apporter, nous pauvres petits thésards... !

Merci, évidemment, à mes collègues de fortune et parfois d'infortune ! Ah, la thèse, cette douce brise qui se transforme parfois (souvent ?!) en ouragan... Sans vous, ça n'aurait vraiment pas été pareil. Merci à tous ceux qui ont, à un moment ou à un autre et pour plus ou moins longtemps, partagé le bureau 314c, 3^{ème} étage, aile nord. Je pense bien sûr à Matthias, Caro, Clément, Fanny, Jean-Seb et, plus, récemment, Karen. Matthias, je ne sais pas ce que je serais devenue sans toi ! Avoir le bureau en face du tien aura vraiment été un plaisir, et, souvent, une vraie bouffée d'oxygène... Merci pour tout, depuis les délires en mode « répliques de films » jusqu'aux nombreux thés partagés, en passant par le fait d'avoir juste été là, simplement. Merci. Caro, en matière de délires, on peut dire que tu n'es pas mal non plus, étant souvent l'instigatrice de ces moments de craquages (soyons honnêtes, si si) ! Merci à toi aussi, car tu as souvent été à l'écoute, et ça aura été vraiment agréable de partager ces

trois années avec toi. Clément, je dois dire qu'il est absolument honteux que toi et Anne soyez partis avant qu'on ait tous soutenu. Non, franchement. Bon, maintenant, on peut s'arranger, si vous m'offrez un billet pour venir chez les kiwis, je suis prête à oublier cet écart ! Plus sérieusement, vous étiez vraiment importants pour moi et ma petite vie de tous les jours au labo. Je vous remercie juste d'être qui vous êtes, vous me manquez beaucoup. Enfin, merci à tous mes autres collègues thésards ou post-docs, que l'on ait juste partagé quelques moments autour d'un café, ou davantage de soirées. Merci donc à Clotilde, Coraline, Aurore, Juliette, Adrien, Emilie, Romain, Morgan, Julia, David, et Cécile. Une mention spéciale à toi, Seb. Ce que tu m'as apporté, et m'apporte toujours, va au-delà de ce tout ce que je pourrais écrire en alignant quelques mots. Nul besoin d'en rajouter, donc, pour que tu comprennes à quel point je te remercie, pour tout.

Je finirai ces quelques lignes en remerciant des personnes qui me sont plus proches, et qui ont, plus ou moins malgré elles, également contribué à ce travail.

Merci à mes parents. Je me souviens de vos paroles, il y a quelques temps maintenant, sur l'importance de faire de notre vie, à Cora et à moi, quelque chose qui nous plait vraiment. J'ai écouté vos conseils, et nous y voilà ! J'ai fait ce que je souhaitais faire depuis si longtemps. Je vous remercie de m'y avoir encouragé, de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je ne sais pas encore ce qui m'attend à l'avenir, mais j'ai tout le temps de le découvrir. Vous m'avez appris qu'il est important d'aller au bout de ce que l'on veut. Et c'est certainement le principe qui a régi ces trois années de thèse. J'espère que vous serez fiers.

Merci à ma grande sœur à moi ! Malgré la distance et le travail qui s'accumule, tu as toujours pris soin de me demander des nouvelles, de me demander comment je m'en sortais. Si ça semble évident pour certains, ça ne l'est pas pour tout le monde. Je te remercie pour tout ça, pour être une super sœur... !

Merci à tous mes proches, famille ou amis, qui m'ont soutenue ces trois dernières années. Votre présence et votre amitié aura été précieuse.

Merci à toi, Fred. Sans toi, je ne serais pas en train d'écrire ces lignes aujourd'hui. Merci de m'avoir encouragée comme tu l'as fait. Pendant cette dernière année et demie de thèse, qui n'aura pas été la plus facile pour moi, tu as été là chaque jour, chaque minute. Tu m'as toujours soutenue. Je ne trouve pas les mots pour te dire comme tu es important pour moi. Ce travail est, en quelque sorte, aussi le tien. Merci...

Table des matières

Introduction générale	8
1. Parasites et cycles de vie complexes	9
2. Une stratégie d'exploitation de l'hôte : la manipulation parasitaire	11
3. Stades larvaires non-infectieux pour l'hôte définitif et altération du comportement de l'hôte intermédiaire : une réelle antinomie ?	14
4. Protection rapprochée de l'hôte par le parasite : entente parfaite ou désaccords masqués ?	18
5. Cohabitation des stades non-infectieux et infectieux : quand partage de l'hôte est synonyme de conflit	21
6. Objectifs de l'étude	23
 Modèle biologique : Le parasite acanthocéphale <i>Pomphorhynchus laevis</i>	 26
1. Les parasites acanthocéphales : généralités	26
2. <i>Pomphorhynchus laevis</i> : cycle de vie et caractéristiques biologiques au sein de ses deux hôtes	29
 Chapitre 1 : Effets de l'acanthelle de <i>Pomphorhynchus laevis</i> sur les défenses anti-prédateurs et la probabilité de prédation de son hôte intermédiaire	 33
Article 1 : Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Gaillard, M., Léger, E. & Rigaud, T. 2011. Protection first then facilitation: a manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. <i>Evolution</i> 65 : 2692-2698.	35
 Chapitre 2 : Mutualisme ou parasitisme ? Quantification des coûts potentiels à l'infection par une acanthelle de <i>P. laevis</i> pour son hôte intermédiaire	 43
A. Effets de l'infection par une acanthelle <i>P. laevis</i> , et de l'utilisation de refuges accrue chez son hôte, sur l'approvisionnement et l'état des réserves énergétiques de <i>G. pulex</i>	43
Article 2 : Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Guvenatam, A. & Rigaud, T. Investigations of foraging and physiological costs resulting from parasite-induced host protection against predation.	47

B. Effet de l'infection par une acanthelle sur la probabilité de mise en couple des mâles amphipodes	76
Article 3 : Dianne, L., Bauer, A., Rigaud, T. & Perrot-Minnot, M.-J. Differential pairing success in amphipods infected with an acanthocephalan according to the developmental stage of the parasite.	79
Chapitre 3 : Conflits intraspécifiques entre acanthelle et cystacanthé de <i>P. laevis</i>	98
Article 4 : Dianne, L., Rigaud, T., Léger, E., Motreuil, S., Bauer, A. & Perrot-Minnot, M.-J. 2010. Intraspecific conflict over host manipulation between different larval stages of an acanthocephalan parasite. <i>Journal of Evolutionary Biology</i> 23 : 2648-2655.	101
Discussion générale et perspectives	110
1. Effet protecteur de l'infection par une acanthelle : caractéristiques et hypothèses sur son évolution	110
<i>Caractéristiques générales de l'effet protecteur</i>	110
<i>Hypothèses évolutives de l'effet protecteur : une stratégie du parasite ?</i>	112
2. L'hôte subit-il des coûts à être protégé par son parasite ?	115
<i>Quels coûts pour l'hôte ? Prise alimentaire et réserves énergétiques</i>	115
<i>Quels coûts pour l'hôte ? Motivation à la reproduction</i>	116
<i>Origine de la protection de l'hôte infecté : induction par le parasite ou stratégie mixte ?</i>	118
3. Conflit acanthelle-cystacanthé : une explication à l'intensité variable de la manipulation comportementale des hôtes infectés	121
4. Remarque de conclusion : perspectives écologiques	124
Bibliographie	127
Annexes	139
<u>Annexe 1.</u> Représentation théorique de l'indice de préférence permettant d'évaluer la prédation sélective d'un hôte potentiel envers des proies infectées ou des proies non-infectées.	141
<u>Annexe 2.</u> Article 5 : Dianne, L., Bollache, L., Lagrue, C., Franceschi, N. & Rigaud T. 2012. Larval size in acanthocephalan parasites: Influence of intraspecific competition and effects on intermediate host behavioural changes. <i>Parasites & Vectors</i> 5 : 166.	145

Introduction générale

Introduction générale

Un parasite est un organisme vivant aux dépens d'un autre organisme, son hôte ; le parasite utilise son hôte comme source de nutriments et comme habitat assurant sa reproduction. La survie de ce parasite implique alors une baisse de l'aptitude phénotypique de l'hôte (Poulin 2007). Le parasitisme ne peut être décrit comme un phénomène statique, l'interaction entre un parasite et son hôte étant dynamique aussi bien dans le temps que dans l'espace, et à des échelles écologiques comme évolutives. L'interaction observée à un moment donné entre un parasite et son hôte est, en effet, issue de la sélection naturelle, d'où la nécessité d'étudier le parasitisme tel que les écologistes évolutionnistes le font : *via* l'étude des pressions de sélection imposées aux parasites par leur environnement (notamment leur hôte) et des réponses à ces pressions apportées par l'évolution (Poulin 2007).

Du point de vue du parasite, l'adaptation à son (ses) hôte(s) implique la sélection de stratégies d'exploitation de l'hôte maximisant son aptitude phénotypique, par exemple son pouvoir infectieux, la complétion de son cycle de vie (transmission d'un hôte à un autre) ou sa production de descendants. L'hôte, quant à lui, subit des pressions de sélection permanentes pour limiter son exploitation par le parasite, et ainsi réduire les effets négatifs du parasitisme sur son aptitude phénotypique. Ceci conduit à une co-évolution permanente entre le parasite et son hôte, induisant une course aux armements entre les deux protagonistes (Combes 2001). Mesurer l'aptitude phénotypique d'un parasite se révèle alors être une tâche particulièrement complexe, puisqu'elle dépend de l'interaction entre le génotype du parasite et celui de son hôte (voir une synthèse dans Lambrechts et al. 2006). De plus, l'aptitude phénotypique d'un parasite est également influencée par les interactions entre son propre génotype (et potentiellement celui de l'hôte) et son environnement direct, tant abiotique (température, quantité et qualité des nutriments) que biotique (présence d'autres espèces de parasites ou d'autres congénères co-infectant l'hôte, état physiologique de l'hôte) (e.g. Vale & Little 2009, voir une synthèse dans Lazzaro & Little 2009). Le génotype d'un parasite a donc une valeur sélective condition-dépendante. Ceci sera d'autant plus vrai si le parasite doit exploiter plusieurs hôtes dans son cycle de vie (i.e. parasite à cycle complexe). La mesure de l'aptitude phénotypique des parasites, et la description des traits d'histoire de vie que cela implique, reste un challenge pour les parasitologistes évolutionnistes, à plus forte raison lorsque ces mesures peuvent avoir des applications concrètes, comme en épidémiologie (Galvani 2003).

Dans cette étude, nous nous intéresserons aux stratégies maximisant l'aptitude phénotypique d'un parasite à cycle complexe ayant la capacité de manipuler le comportement de son hôte intermédiaire. Nous nous focaliserons plus précisément sur la stratégie d'optimisation de l'aptitude phénotypique du stade non-infectieux de ce parasite, avant même qu'il ne change le comportement de son hôte.

Dans ce chapitre introductif, nous commencerons donc par la description de l'évolution des cycles complexes chez les parasites, avant de nous intéresser à une stratégie d'optimisation de la transmission commune à de nombreux parasites à transmission trophique : l'altération du comportement de l'hôte intermédiaire. Nous nous interrogerons ensuite sur la sélection d'une stratégie de protection de l'hôte vis-à-vis de la prédation chez les stades non-infectieux (pour l'hôte suivant dans le cycle de vie) des parasites manipulateurs. Puis, nous évaluerons les potentiels coûts et bénéfices liés à la sélection d'une telle stratégie chez les stades parasitaires non-infectieux. Enfin, nous discuterons des conflits d'intérêts intraspécifiques pouvant émerger entre stades non-infectieux et infectieux partageant le même hôte intermédiaire, avant de définir les objectifs de l'étude.

1. Parasites et cycles de vie complexes

Chez les helminthes, la grande diversité actuellement observée dans les cycles de vie parasitaires amène naturellement à s'interroger sur leur évolution. En particulier, les cycles de vie complexes, c'est-à-dire comportant au moins deux hôtes – un hôte intermédiaire et un hôte définitif –, imposent aux écologistes évolutionnistes de rivaliser d'imagination pour expliquer leur apparition ainsi que leur maintien. Parmi eux, Parker et al. (2003) ont proposé une hypothèse basée sur les chevauchements spatiaux entre l'hôte déjà existant et les hôtes potentiels. Deux scénarios évolutifs ont été proposés ; le premier, parfois jugé comme étant le plus probable (voir Parker et al. 2003), est l'incorporation *en aval*, ou *upward*, où un nouvel hôte s'ajoute après l'hôte existant. Dans ce cas, l'hôte existant devient l'hôte intermédiaire, où le parasite effectue une partie de sa croissance larvaire, et le nouvel hôte l'hôte définitif, où le parasite effectue sa reproduction. L'hypothèse du chevauchement spatial des niches écologiques des hôtes existants et potentiels permet d'expliquer une telle intrusion. L'hypothèse illustrée par Parker et al. (2003) est que, si le premier hôte existant est régulièrement ingéré par la même espèce de prédateur, les pressions de sélection agissent

alors dans le sens d'une survie du parasite dans ce prédateur, lui permettant ainsi d'augmenter ses chances de reproduction futures. Les coûts associés à la survie dans ces deux hôtes (plutôt qu'uniquement dans le premier hôte existant) doivent être très faibles pour permettre une telle évolution, et évidemment inférieurs aux bénéfices apportés par ce nouveau cycle complexe (Parker et al. 2003). Ces bénéfices se traduisent notamment par un succès reproducteur accru : en admettant que la fécondité du parasite augmente avec sa taille, les parasites capables de retarder leur maturité sexuelle de l'hôte existant vers le nouvel hôte (le prédateur) seront sélectionnés. Si la taille reproductrice atteinte chez le second hôte est supérieure à celle atteinte chez le premier hôte, son aptitude phénotypique se verra relativement augmentée et la reproduction dans le premier hôte sera contre-sélectionnée. Le premier hôte (déjà existant) deviendrait alors l'hôte intermédiaire et le second (nouveau) l'hôte définitif (Parker et al. 2003). Le deuxième scénario considère, lui, une incorporation *en amont*, ou *downward* ; les propagules du parasite, libres dans l'environnement et d'ordinaire ingérées par un seul prédateur (l'hôte existant), sont également ingérées par une nouvelle espèce, proie du précédent. La sélection favorise alors les parasites capables de survivre dans ce nouvel hôte. Si la reproduction est impossible dans ce nouvel hôte, il devient l'hôte intermédiaire du parasite ; l'hôte définitif demeure l'hôte existant à l'origine (Parker et al. 2003). Ainsi, selon les auteurs, un nouvel hôte intermédiaire peut être ajouté entre deux hôtes existants pourvu qu'il augmente les chances de transmission du parasite entre ces hôtes. Un autre modèle permettant d'expliquer les incorporations d'hôtes intermédiaires prédit, quant à lui, que les cycles de vie complexes seront sélectionnés seulement si les hôtes intermédiaires potentiels (les proies) sont plus abondants que les hôtes définitifs (les prédateurs) (Choisy et al. 2003).

Toutes ces hypothèses et modèles amènent à une réflexion sur le rôle évolutif des hôtes intermédiaires chez les helminthes à cycle complexe. Selon Chubb et al. (2010), les hôtes intermédiaires jouent un rôle prépondérant dans l'évolution des traits d'histoire de vie des helminthes ; pour les parasites, les bénéfices (survie et croissance jusqu'à la transmission) mais aussi les coûts (risque de mortalité de l'hôte dû à la croissance du parasite) liés aux hôtes intermédiaires modulent la sélection de stratégies optimales d'exploitation de l'hôte (Ball et al. 2008, Parker et al. 2009a, 2009b). Particulièrement, l'utilisation de la chaîne trophique chez de nombreux helminthes à cycle complexe est à l'origine de la sélection de stratégies d'exploitation de l'hôte singulières. En effet, à l'inverse des parasites quittant leur hôte intermédiaire pour chercher activement leur hôte définitif, les parasites à transmission trophique doivent « attendre » la prédation de leur hôte intermédiaire par leur hôte définitif pour compléter leur croissance et se reproduire. Les hôtes intermédiaires jouent alors un rôle

de *véhicule* pour le parasite (Lafferty 1999). De toute évidence, ceci implique des coûts pour le parasite, notamment si, une fois infectieux pour l'hôte définitif, son hôte intermédiaire meurt avant d'être prédaté. Pour le parasite, la maximisation de son aptitude phénotypique signifie la sélection de stratégies d'exploitation optimales de l'hôte intermédiaire, de telle sorte que les probabilités de transmission vers l'hôte définitif soient accrues.

2. Une stratégie d'exploitation de l'hôte : la manipulation parasitaire

L'augmentation des probabilités de transmission vers l'hôte suivant est liée, chez de nombreux parasites à transmission trophique, à une altération du phénotype de leur hôte intermédiaire. Cette altération peut concerner diverses caractéristiques de l'hôte telles que sa morphologie, sa physiologie (e.g. son système immunitaire), ou encore son comportement. Les recherches passées et actuelles ont montré un grand intérêt aux cas d'altération du comportement de l'hôte intermédiaire (Moore 2002). Nombreuses sont les études qui ont décrit les altérations du phénotype de l'hôte intermédiaire comme étant adaptatives pour le parasite, lui permettant d'augmenter ses chances de transmission vers l'hôte suivant dans le cycle de vie. Ce lien a amené à nommer ces altérations « manipulation parasitaire » ou, plus particulièrement, « manipulation comportementale » (voir des exemples de manipulation parasitaire dans Poulin & Thomas 1999, Moore 2002, Poulin 2007). Cependant, le caractère adaptatif des manipulations comportementales n'a que rarement été démontré de façon rigoureuse. Poulin (1995) a établi plusieurs critères qui, lorsqu'ils sont rassemblés, permettraient de conclure quant au caractère adaptatif de la manipulation comportementale. La complexité du comportement exprimé par un hôte manipulé a été, dans un premier temps, l'un de ces critères ; celui-ci a été mis de côté par la suite, n'étant plus considéré, à juste titre, comme indispensable (Poulin 2010). En effet, pour que la manipulation soit considérée comme résultant de la sélection naturelle, donc comme étant adaptative, ce n'est pas tant le comportement manipulé de l'hôte qui se doit d'être complexe que les mécanismes mis en place pour y parvenir. De plus, tous les mécanismes et tous les phénotypes, aussi simples ou complexes soient-ils, peuvent être le produit d'une sélection. Si la complexité apparente d'un phénomène peut suggérer une origine adaptative (sans en être toutefois la garante), la réciproque n'est pas vraie : tous les phénomènes adaptatifs ne sont pas forcément complexes.

Un autre critère évoqué par Poulin (1995, 2010) est la finalité apparente du changement comportemental, autrement dit l'adéquation *a priori* (i.e. avant même l'observation du changement comportemental, par opposition à *a posteriori* où le risque est de

vouloir trouver une finalité au changement de comportement) entre d'une part la manipulation comportementale exercée, et d'autre part la complétion du cycle de vie parasitaire, notamment la transmission du parasite vers l'hôte suivant dans le cycle de vie. Les helminthes à cycles complexes subissent en effet une longue période de croissance dans leur hôte intermédiaire, au cours de laquelle leur anatomie et/ou leur physiologie ne leur permet pas encore de s'établir dans l'hôte suivant. Une transmission prématurée de la larve non-infectieuse du parasite vers son hôte suivant a donc pour conséquence la mort du parasite. Un parasite ne devrait alors manipuler le comportement de son hôte intermédiaire et favoriser sa transmission que lorsqu'il est infectieux pour l'hôte suivant dans le cycle, c'est-à-dire lorsqu'il peut s'y établir avec succès. Ceci a été observé dans de nombreux systèmes hôte-parasite, notamment chez les parasites acanthocéphales. Bethel & Holmes (1974) ont par exemple montré que le cystacanthé (stade larvaire infectieux) de *Polymorphus paradoxus* (parasite d'oiseaux aquatiques) manipule le comportement de son hôte intermédiaire, l'amphipode *Gammarus lacustris*, uniquement lorsqu'il est capable de s'établir dans son hôte définitif, c'est-à-dire environ 10 jours après l'invagination du proboscis du parasite (synonyme de passage du stade acanthelle, non-infectieux, au stade cystacanthé, infectieux). Une autre étude a montré que le parasite acanthocéphale de poisson *Pomphorhynchus laevis* n'altère la photophobie naturelle du gammare *Gammarus pulex* que lorsque le stade cystacanthé est atteint, avec un accroissement de l'intensité de la manipulation 10 jours après avoir atteint ce stade infectieux (Franceschi et al. 2008). Ce phénomène a également été montré chez des parasites cestodes (Hurd & Fogo 1991, Poulin et al. 1992). Chez divers parasites trématodes à transmission trophique, seul le stade métacercarie (infectieux) montre des altérations comportementales de l'hôte synonymes d'accroissement des chances de transmission, soit au niveau de l'unique hôte intermédiaire chez des parasites du genre *Microphallus* (Levri & Lively 1996, McCarthy et al. 2000), soit au niveau du second hôte intermédiaire chez *Diplostomum spathaceum* (Seppälä et al. 2005). Enfin, l'adéquation de la manipulation du comportement de l'hôte avec l'infectivité du parasite a également été montrée chez des parasites protozoaires. Des parasites de la malaria appartenant au genre *Plasmodium* manipulent le comportement d'alimentation de leur vecteur sur leur hôte. Au stade sporozoïte, infectieux pour l'hôte, les moustiques infectés piquent davantage leur hôte (Anderson et al. 1999) et ont besoin d'un volume sanguin supérieur à celui des vecteurs sains pour cesser la recherche d'hôtes potentiels (Koella et al. 2002). Ce comportement n'apparaît pas au stade précédent non-infectieux, l'oocyste, et est supposé augmenter la transmission des stades sporozoïtes de la malaria du vecteur vers l'hôte. Rogers & Bates (2007) ont montré le

même phénomène chez le vecteur de la leishmaniose. Le critère de l'adéquation entre manipulation de l'hôte et complétion du cycle de vie parasitaire ne suffit cependant pas pour certifier le caractère adaptatif de la manipulation comportementale. Les changements comportementaux de l'hôte peuvent être, en effet, de « simples » effets secondaires de l'infection, ou encore une réaction de défense de l'hôte coïncidant avec le changement de stade du parasite (de non-infectieux à infectieux). En admettant par exemple que le stade infectieux du parasite ne mobilise plus les mêmes ressources chez son hôte que le stade non-infectieux, cela pourrait avoir des conséquences directes ou indirectes sur le comportement de l'hôte intermédiaire (l'invasion d'un tissu particulier – muscles, cerveau – de l'hôte est par exemple souvent à l'origine des changements phénotypiques observés chez l'hôte, voir Moore (2002) pour une synthèse détaillée). Ces propos sont toutefois à nuancer en considérant qu'un sous-produit d'une infection par un parasite peut être l'objet d'une exaptation, ayant donné lieu par la suite à une adaptation secondaire. Par exemple, des changements phénotypiques ont pu être sélectionnés *a posteriori* s'ils augmentent l'aptitude phénotypique du parasite (par exemple sa transmission entre hôtes), alors qu'ils n'ont pas été produits dans cette optique à l'origine (Thomas et al. 2012).

Pour en arriver à la conclusion de l'adaptation, il est nécessaire que l'aptitude phénotypique du parasite soit directement liée à l'induction de la manipulation (ou positivement corrélée à son intensité) (Poulin 2010). Toutefois, il est souvent difficile de mesurer l'aptitude phénotypique des individus, ceci impliquant notamment de mesurer la survie de la descendance à la génération suivante (voir cependant Hammerschmidt et al. (2009) pour une mesure de l'aptitude phénotypique des larves de *Schistocephalus solidus*). Il n'en reste pas moins que la mesure des traits liés à la transmission des parasites manipulateurs peut être considérée comme étant révélatrice de l'aptitude phénotypique future du parasite (Poulin 1995) car elle constitue une composante clé de cette aptitude : une transmission faible implique une faible probabilité d'atteindre le stade reproducteur chez l'hôte définitif. Chez les parasites à transmission trophique, cela consiste à tester la susceptibilité des hôtes intermédiaires infectés (et manipulés) à la prédation par un hôte définitif du parasite, comparativement à la susceptibilité des hôtes non-infectés. Plusieurs études ont ainsi montré le caractère adaptatif de la manipulation comportementale (Moore 2002). Il faut cependant préciser que la corrélation changement comportemental de l'hôte / probabilités de prédation n'assure pas automatiquement du fait qu'un changement comportemental de l'hôte est directement lié à l'augmentation de sa prédation, l'état physiologique de l'hôte ainsi que la présence d'autres traits comportementaux altérés pouvant entrer en ligne de compte. Il est

donc indispensable de démontrer le lien direct entre un changement comportemental chez l'hôte et les probabilités de transmission du parasite, en s'assurant que toutes choses sont égales par ailleurs (Cézilly et al. 2010).

La présence d'effets bénéfiques de la manipulation comportementale de l'hôte sur l'aptitude phénotypique du parasite – soit immédiate (augmentation de la transmission vers l'hôte suivant) soit future (survie et fécondité dans l'hôte définitif) – atteste alors de son caractère adaptatif. Précisons toutefois que la preuve ultime réside probablement dans l'investigation des prévalences parasitaires *in natura* chez les hôtes intermédiaires *versus* les hôtes définitifs : une plus forte prévalence chez les hôtes définitifs que chez les hôtes intermédiaires démontre une favorisation de la transmission effective du parasite vers un hôte adéquat (voir un exemple chez les acanthocéphales dans Lagrue et al. 2007a).

3. Stades larvaires non-infectieux et altération du comportement de l'hôte intermédiaire : une réelle antinomie ?

Prenons le cas classique d'un helminthe à deux hôtes et à transmission trophique, l'hôte intermédiaire et l'hôte définitif ne présentant des niches écologiques que partiellement chevauchantes. *A priori*, comme nous l'avons vu, tout changement comportemental de l'hôte intermédiaire ayant pour caractéristique (i) d'être concomitant avec le développement du stade larvaire infectieux au sein de cet hôte, et (ii) de mettre hôtes intermédiaires et définitifs en contact, augmenterait considérablement les chances de transmission du parasite vers l'hôte définitif. Les parasites capables d'induire ce type de changement comportemental chez leur hôte au stade infectieux seraient alors favorisés par la sélection naturelle. Avant ce stade infectieux, une transmission prématurée vers l'hôte définitif se solderait alors inévitablement par la mort du parasite, impliquant qu'aucune manipulation du comportement de l'hôte favorisant la transmission du parasite ne devrait être observée à ce stade. De la même manière que la stratégie optimale du stade infectieux est l'augmentation de ses chances de transmission vers l'hôte définitif, la stratégie optimale de la larve non-infectieuse est de survivre jusqu'à atteindre le stade infectieux. De fortes pressions de sélection agissent alors dans le sens d'une réduction maximale des risques de mortalité de l'hôte intermédiaire. Au-delà des stratégies d'exploitation prudentes des hôtes, sélectionnées chez certains parasites et évitant une mortalité massive et précoce (voir une synthèse dans Buckling & Brockhurst 2008), une partie de la réduction de mortalité de l'hôte peut également passer par une réduction de la prédation. *A priori*, donc, tout changement comportemental de l'hôte

intermédiaire ayant pour caractéristiques, (i) d'apparaître pendant la phase non-infectieuse du développement du parasite, et (ii) d'empêcher tout contact entre l'hôte intermédiaire et ses prédateurs potentiels (qu'ils soient hôtes définitifs du parasite ou non), réduirait fortement les risques de mortalité de l'hôte intermédiaire par la prédation. Toutes choses étant égales par ailleurs, une telle stratégie de « protection » devrait être sélectionnée : un parasite cumulant les deux « altérations inverses » du comportement anti-prédateur de l'hôte (causant d'abord une suppression, puis une augmentation de la prédation de cet hôte) aurait alors un avantage sélectif sur ses congénères ne présentant qu'une seule ou aucune de ces manipulations. Le caractère adaptatif, pour un parasite, d'un tel patron de manipulation semble être plus évident, bien que ceci nécessite toujours d'être validé empiriquement par des tests montrant respectivement la diminution puis l'accroissement de la transmission vers l'hôte suivant dans le cycle, par rapport à des individus non-infectés.

Récemment, Parker et al. (2009c) ont formalisé ce raisonnement, afin de déterminer les conditions d'évolution de la manipulation de l'hôte induite par les parasites à transmission trophique. Ils ont étudié, dans un premier temps, l'évolution de la manipulation *stricto sensu*, c'est-à-dire l'augmentation des probabilités de prédation de l'hôte intermédiaire induite par le stade larvaire infectieux du parasite. Dans un second temps, les conditions d'évolution de la suppression de la prédation (la protection de l'hôte évoquée dans le paragraphe précédent) ont été modélisées. De ce modèle, les auteurs ont retiré que les deux types d'altération ont des conditions d'évolution très différentes (voir tableau 1). Une fois le stade infectieux atteint, la sélection d'une stratégie d'augmentation de la prédation dépend des risques de mortalité du parasite. Ces risques de mortalité se situent sur un continuum allant d'une mortalité du parasite due à une durée de vie limitée dans l'hôte intermédiaire (i.e. une mortalité « intrinsèque », où le parasite meurt une fois l'âge maximum atteint) à une mort du parasite due uniquement à la prédation de son hôte intermédiaire par un non-hôte (i.e. une mortalité « extrinsèque »). Ceci implique des pressions de sélection spécifiques à chaque type de mortalité du parasite (âge-dépendante ou âge-indépendante, voir tableau 1), donc des stratégies d'optimisation de la transmission tout aussi particulières. Par exemple, lorsque le risque de mortalité du parasite infectieux n'est pas dépendant de son âge (i.e. il est essentiellement dû à la prédation de son hôte intermédiaire par un non-hôte du parasite), la manipulation de l'hôte intermédiaire sera alors sélectionnée seulement si elle permet au parasite de cibler un hôte dans lequel il peut s'établir. A l'inverse, lors du développement du

Tableau 1. Stratégies d'exploitation de l'hôte intermédiaire inhérentes à chaque stade de développement de la larve du parasite.

	Stade non-infectieux	Stade infectieux
« Intérêts » du parasite	Croissance, survie de l'hôte intermédiaire	Transmission vers l'hôte suivant
Risques de mortalité du parasite	Prédation de l'hôte intermédiaire	Age-dépendants espérance de vie limitée au sein de l'hôte intermédiaire
Pression de sélection résultante	Stade infectieux jamais atteint	Pas d'évènement de transmission
Stratégie mise en place	Suppression <i>générale</i> de la prédation par des hôtes comme par des non-hôtes	Augmentation <i>générale</i> de la prédation Prédation par des hôtes = prédation par des non-hôtes MAIS bénéfices transmission hôtes >>> coûts prédation non-hôtes + coûts non-transmission Augmentation <i>ciblée</i> de la prédation Prédation par des hôtes >> prédation par des non-hôtes DONC bénéfices transmission hôtes >>> coûts prédation non-hôtes

stade non-infectieux dans l'hôte intermédiaire, la mortalité de l'hôte par la prédation avant que le parasite ait atteint le stade infectieux représente la plus importante pression de sélection pouvant mener à la sélection d'une stratégie de suppression de la prédation (on peut, en effet, supposer que l'adaptation du parasite à son hôte ait conduit à une virulence modérée de ce stade parasitaire envers son hôte, limitant les risques de mortalité de l'hôte dus à l'épuisement de ses propres ressources). La prédation de l'hôte doit alors être réduite au minimum, et ce quel que soit le prédateur. La suppression de la prédation sera alors sélectionnée si elle supprime les risques de prédation *générale* de l'hôte.

La suppression de la prédation présentant des conditions d'évolution beaucoup plus simples que l'augmentation de la prédation, elle devrait être relativement répandue chez les parasites à cycles complexes. Parker et al. (2009c) ont pourtant noté que très peu d'études s'y sont intéressées, l'expliquant notamment par la difficulté d'observer ce genre de phénomène. S'il semble réaliste qu'un animal montrant un comportement inhabituel ait davantage attiré l'attention des chercheurs qu'un animal caché fuyant les prédateurs, il n'en reste pas moins que des vérifications empiriques de ce modèle sont nécessaires. Depuis la publication du modèle de Parker et al. (2009c), une unique étude a vérifié sa validité avec succès, bien que de façon incomplète (Hammerschmidt et al. 2009). Les auteurs ont étudié le cycle du cestode *Schistocephalus solidus*, un helminthe à trois hôtes (deux hôtes intermédiaires – un copépode cyclopoïde, puis l'épinoche à trois épines *Gasterosteus aculeatus* – et un hôte définitif oiseau ou mammifère). *S. solidus* se transmet *via* la chaîne trophique de son premier à son second hôte intermédiaire ; les copépodes infectés par le parasite montrent des altérations de comportement ayant pour conséquence d'augmenter leurs probabilités de prédation par l'épinoche (Wedekind & Milinski 1996). Dans leur étude, Hammerschmidt et al. (2009) ont notamment montré que, dans un premier temps, les copépodes infectés par le stade non-infectieux pour l'épinoche ont une activité moindre que les copépodes sains. Cette activité est par la suite accrue et devient largement supérieure, chez les copépodes infectés par le stade infectieux pour l'épinoche, à celle des copépodes sains. Cette permutation entre deux altérations opposées intervient au moment optimal durant lequel le parasite doit être transmis du copépode à l'épinoche, en termes de compromis entre temps passé dans le copépode et aptitude phénotypique future (survie et fécondité du parasite dans l'épinoche, Hammerschmidt et al. 2009). Toutefois, un élément important manque à la démonstration. Bien que, dans ce système hôte-parasite, l'adéquation entre altérations comportementales de l'hôte et complétion du cycle parasitaire semble réelle, le caractère adaptatif des changements comportementaux induits par la larve non-infectieuse du parasite n'a pas été mis en évidence.

Si la manipulation du copépode induite par le stade infectieux du parasite est bien traduite en une augmentation de la prédation des copépodes infectés (Wedekind & Milinski 1996), l'inverse lorsque le parasite n'est pas infectieux reste à démontrer et manque dans la validation du modèle de Parker et al. (2009c).

Des changements comportementaux de l'hôte induits par des stades larvaires non-infectieux, et supposés réduire ses risques de mortalité par la prédation, ont également été mis en évidence chez le parasite de la malaria et son vecteur. Anderson et al. (1999) ont montré que les moustiques de l'espèce *Anopheles stephensi*, infectés par les stades oocystes du parasite *Plasmodium yoelii nigeriensis*, non-infectieux pour l'hôte suivant, persistent moins à piquer cet hôte après avoir été dérangés pendant leur repas sanguin que les moustiques sains. Les moustiques infectés par les stades soporozoïtes (infectieux pour l'hôte), eux, entrent plus souvent en contact avec leur hôte que les moustiques sains. Le même genre de résultat a été mis en évidence chez le vecteur *Aedes aegypti* et son parasite *Plasmodium gallinaceum*, où les moustiques infectés par des oocystes ont besoin d'un volume sanguin moindre pour cesser la recherche d'un nouvel hôte pour se nourrir, et ont donc moins besoin de piquer que les hôtes sains (Koella et al. 2002). Ces données semblent indiquer une altération active du comportement du vecteur par le parasite non-infectieux, lui permettant potentiellement d'augmenter sa survie (par un risque de mortalité moindre du vecteur), ainsi que de limiter les risques de transmission du parasite du vecteur vers l'hôte. Mais, une fois encore, la démonstration ultime de l'effet de ces changements comportementaux sur la survie du couple vecteur/parasite en cours de maturité, donc sur l'aptitude phénotypique du parasite, n'a pas été réalisée.

4. Protection rapprochée de l'hôte par le parasite : entente parfaite ou désaccords masqués ?

En adoptant le point de vue de l'hôte, la protection exercée par un parasite non-infectieux peut être perçue, dans un contexte évolutif, de différentes façons. Dans un premier temps, il est très tentant d'assimiler la protection de l'hôte à un mutualisme transitoire, les intérêts de l'hôte et du parasite semblant alignés pendant cette phase précise du développement parasitaire. Les deux protagonistes retirent effectivement des bénéfices certains de leur interaction en termes de survie à la prédation, et semblent augmenter par cette voie leurs aptitudes phénotypiques respectives. Cependant, les conditions favorables à l'évolution d'un mutualisme entre deux protagonistes (voir par exemple Herre et al. 1999) sont assez éloignées de celles rencontrées

dans les interactions hôtes-parasites manipulateurs. Il est d'ailleurs assez difficile d'imaginer le cas d'un organisme à la fois mutualiste et parasite au cours de son existence, sauf si les conditions extérieures biotiques (i.e. l'hôte) et abiotiques (i.e. l'environnement extérieur) changent. De tels organismes, nommés « parasites pléiotropes », ont été décrits par Michalakis et al. (1992). Ces parasites pléiotropes sont tantôt bénéfiques (chez un hôte jeune ou dans un environnement précis), tantôt coûteux pour leur hôte (chez un hôte plus âgé ou dans un nouvel environnement). La pléiotropie peut alors être temporelle ou spatiale. Ces parasites sont par conséquent assimilés à un stade intermédiaire dans le continuum parasitisme-mutualisme, permettant potentiellement d'expliquer l'évolution de l'un à l'autre. Une telle comparaison semble difficile dans le cas des helminthes à transmission trophique, les deux actions contraires sur le comportement de l'hôte étant fortement en adéquation avec degré d'infectivité (i.e. l'âge) du parasite, alors que l'âge de l'hôte infecté est variable.

Une autre possibilité considère que les organismes montrant d'abord une protection de leur hôte, puis favorisant leur exposition à l'hôte définitif, demeurent malgré tout des parasites, même pendant la phase singulière de suppression des risques de prédation de l'hôte. Il n'en reste pas moins que, lors de cette phase, l'hôte semble en retirer des bénéfices pour sa propre survie. Nous pourrions être là dans un cas de compromis entre les stratégies de l'hôte et du parasite (voir Wellnitz (2005) pour la notion de *negociated settlement* entre hôte et parasite, plutôt qu'un *gagnant* – le parasite – et un *perdant* – l'hôte –). Nous pouvons alors proposer que la survie accrue des hôtes infectés, par rapport aux hôtes sains, soit la conséquence d'une compensation de l'hôte au parasitisme. En effet, selon Lefèvre et al. (2008, 2009), les hôtes incapables de résister à l'infection (notamment *via* l'immunité) sont sélectionnés s'ils sont en mesure de compenser au moins en partie les coûts dus au parasitisme en ajustant leurs traits d'histoire de vie. En réponse, les parasites capables d'exploiter cette réponse compensatoire de l'hôte pourraient également être sélectionnés. Les parasites pourraient alors avoir un effet négatif sur un trait de l'hôte directement lié à son aptitude phénotypique, comme la survie, pourvu que l'hôte y réponde en compensant ces effets négatifs par l'augmentation de sa fécondité, par exemple. Si ces réponses compensatoires de l'hôte sont bénéfiques pour la transmission du parasite, l'exploitation des réponses compensatoires de l'hôte par le parasite sera sélectionnée comme une stratégie d'augmentation de la transmission (Thomas et al. 2012). Les changements comportementaux observés chez l'hôte seraient donc le résultat d'une co-évolution entre traits de l'hôte et du parasite ; le phénotype observé étant exprimé à la fois par l'hôte et le parasite, et les deux parties en retirent des bénéfices (Lefèvre et al. 2008). Dans le cas de la protection de l'hôte

intermédiaire par un parasite non-infectieux, l'augmentation de la survie de l'hôte pourrait être la conséquence directe de l'influence négative du parasite sur un trait de l'hôte, tel que sa croissance. Les coûts liés au parasitisme seraient alors compensés par l'hôte par une survie accrue et, potentiellement, par une fécondité augmentée ; si le parasite peut percevoir l'infection dont il est l'objet, les intérêts de l'hôte résident effectivement surtout dans une fécondité immédiate. Une réponse plastique sur la fécondité est connue chez de nombreux hôtes infectés ou percevant des risques d'infection (voir une synthèse dans Agnew et al. 2000). Il est donc indispensable de quantifier les coûts et bénéfices liés à l'infection par un parasite non-infectieux chez un hôte intermédiaire. Si les deux parties en retirent effectivement des bénéfices, ou du moins ne semblent pas être en conflit lors de cette phase de croissance du parasite, l'hypothèse de l'exploitation des réponses compensatoires de l'hôte pourrait se révéler la plus adéquate pour expliquer une telle situation.

A l'inverse, si l'infection par un parasite non-infectieux pour l'hôte suivant implique des effets négatifs sur d'autres traits de l'hôte liés à son aptitude phénotypique, la protection de l'hôte induite par le parasite non-infectieux serait probablement issue d'une manipulation active de la part du parasite. Bien que des bénéfices apparents sur la survie soient perçus par l'hôte, des conflits d'intérêts entre les deux protagonistes pourraient émerger d'une telle situation (voir, par exemple, Schwartz & Koella 2001). En effet, un hôte fuyant les prédateurs, par exemple en se cachant davantage ou en ayant une activité moindre que les individus sains, aurait également moins de possibilités de se nourrir, ou encore d'accéder à un partenaire reproducteur. Chez de nombreux organismes-hôtes, il existe un compromis entre survie d'une part, et reproduction et/ou approvisionnement d'autre part (voir Schwartz & Koella 2001 pour une synthèse sur les moustiques vecteurs de la malaria). Ainsi, même si les intérêts du parasite et de l'hôte semblent alignés à un moment donné, un parasite altérant le comportement de son hôte de sorte à augmenter sa survie impose potentiellement des contraintes sur d'autres traits d'histoire de vie de l'hôte. L'optimum de l'hôte en termes d'ajustement entre ses différents traits d'histoire de vie serait donc décalé. La protection de l'hôte induite par le parasite serait alors bénéfique pour ce dernier et coûteuse pour le premier, et resterait dans la définition du parasitisme. Dans ce cas, la protection de l'hôte induite par le stade non-infectieux d'un parasite pourrait être assimilée à la notion de *garde du corps*, ou *bodyguarding*, comme expliqué par Maure et al. (sous presse).

Une quantification des coûts pour l'hôte induits par une telle protection est donc essentielle pour la caractérisation de ce type d'altération de comportement. Ceci implique de mesurer notamment les capacités d'approvisionnement de l'hôte. Il serait, de même,

intéressant de relier les coûts pour l'hôte à d'éventuels coûts, plus indirects, pour le parasite. Cependant, une mesure des coûts liés à la protection de l'hôte sur, par exemple, la fécondité future du parasite paraît plus compliquée à mettre en place, puisque la fécondité du parasite adulte est le produit des compromis subis par le parasite aux stades larvaires à la fois non-infectieux et infectieux. En effet, les parasites infectieux pourraient eux-mêmes avoir à faire face à de nombreux coûts sur leur aptitude phénotypique, potentiellement liés à l'induction de la manipulation (mécanismes physiologiques mis en place), ou encore aux risques de mortalité accrus subis par les parasites manipulateurs (voir Thomas et al. 2005 et Poulin et al. 2005 pour une discussion générale sur les coûts associés à la manipulation). D'une façon générale, le fait de devoir exploiter de façon optimale au moins deux hôtes (généralement un invertébré, hôte intermédiaire, et un vertébré, hôte intermédiaire et/ou définitif) impose de nombreux coûts directs et indirects sur l'aptitude phénotypique du parasite qui les exploite, ceux-ci ayant généralement des physiologies (e.g. systèmes immunitaires) très différentes (Gower & Webster 2004, mais voir Hammerschmidt & Kurtz 2005).

5. Cohabitation des stades non-infectieux et infectieux : quand partage de l'hôte est synonyme de conflit

Le fait de devoir partager son hôte intermédiaire avec un autre parasite (conspécifique ou hétérospécifique) influence fortement l'aptitude phénotypique d'un parasite, l'hôte ayant des ressources limitées. Il en résulte une compétition entre parasites pour l'exploitation des ressources de leur hôte, un phénomène relativement bien documenté, que cette compétition soit interspécifique (e.g. Fredensborg & Poulin 2005, Poulin et al. 2003a) ou intraspécifique (e.g. Dezfuli et al. 2001, Dianne et al. 2012). L'hôte intermédiaire représente également un véhicule permettant la transmission des parasites vers leurs hôtes définitifs respectifs (Lafferty 1999) ; la co-infection de l'hôte intermédiaire par plusieurs parasites peut alors être une source de conflit pour la transmission, notamment lorsque l'un deux, ou les deux parasites, manipule(nt) le comportement de leur hôte.

Les investigations des conflits entre macroparasites portent en quasi-totalité sur des conflits interspécifiques (e.g. Barger & Nickol 1999, Cézilly et al. 2000, Thomas et al. 2002, Haine et al. 2005, Lagrue & Poulin 2008), ce qui peut s'expliquer par la variété interspécifique des modes de transmission et des cycles de vie parasitaires, offrant alors de nombreuses opportunités de conflits. Les conflits intraspécifiques, quant à eux, sont très rarement explorés (voir Lagrue et al. 2007b pour un exemple sur les trématodes). Pourtant, il

existe un potentiel de conflit pour la transmission lorsque deux parasites conspécifiques, manipulateurs et différant dans leur maturité partagent le même hôte intermédiaire (Rigaud & Haine 2005). En effet, si le stade non-infectieux protège son hôte intermédiaire de tout risque de prédation alors que le stade infectieux accroît ses chances de transmission *via* la prédation de son hôte, la multidimensionalité – d’ordinaire séquentielle (Thomas et al. 2012) – de leurs manipulations entraîne un conflit sur l’exploitation de l’hôte.

Lorsque les co-infections de ce type sont fréquentes *in natura*, les pressions de sélection résultantes pourraient conduire à la mise en place d’un sabotage, par le stade non-infectieux, de la manipulation comportementale de l’hôte induite par le stade infectieux (comme dans certains conflits interspécifiques, voir Thomas et al. 2002 et Haine et al. 2005). Le stade non-infectieux sortirait alors « vainqueur » du conflit. A l’inverse, l’altération du comportement de l’hôte induite par le stade infectieux pourrait prendre le pas sur la protection de l’hôte exercée par le stade non-infectieux. Cette forme de résolution de conflit s’apparente au hijacking, tel que décrit par Lafferty (1999) et Poulin (2007), où la manipulation induite par un parasite surpasse celle de l’autre. Enfin, si les pressions de sélection amenant à l’évolution de stratégies de sabotage ne sont pas suffisamment fortes, ce qui peut se produire si les co-infections sont très rares *in natura*, la co-infection des stades non-infectieux et infectieux peut se traduire par une manipulation intermédiaire de leur hôte, apparaissant alors comme désavantageuse pour les deux protagonistes. Seuls Sparkes et al. (2004) ont cherché à établir l’issue d’un tel conflit sur la manipulation comportementale de l’hôte. Le parasite acanthocéphale *Acanthocephalus dirus* modifie la couleur du corps de son hôte intermédiaire, le crustacé isopode *Caecidotea intermedius*, le rendant plus visible pour son hôte définitif poisson. D’après Sparkes et al. (2004), le stade non-infectieux d’*A. dirus* n’est pas capable d’empêcher le changement phénotypique induit par le stade infectieux ; les co-infections composées de différents stades larvaires du parasite induisent une coloration du corps similaires à celle induite par la larve mature seule. Toutefois, ce modèle hôte-parasite n’implique *a priori* pas de protection de l’hôte intermédiaire de la part du stade non-infectieux, et la manipulation exercée par le stade infectieux n’a pas été prouvée comme étant une adaptation du parasite lui permettant d’accroître ses chances de transmission à l’hôte définitif. Il serait intéressant de reproduire une telle expérience avec un parasite capable de protéger puis de manipuler son hôte intermédiaire, afin d’évaluer le potentiel de conflits évolutifs entre individus conspécifiques et leur résolution, ainsi que leurs impacts sur l’aptitude phénotypique de chaque parasite en interaction.

6. Objectifs de l'étude

Le premier chapitre de cette étude s'intéresse à tester l'existence d'une stratégie dite de « suppression de la prédation », comme prédite par Parker et al. (2009c), chez le stade larvaire non-infectieux (pour l'hôte définitif) d'un parasite acanthocéphale infectant un hôte intermédiaire amphipode (voir la section suivante intitulée « modèle biologique »). L'intensité des comportements anti-prédateurs des hôtes sains et infectés a été mesurée par l'utilisation d'un refuge, en présence ou non de signaux de prédateur dans l'environnement. Pour aller plus loin que la vérification empirique apportée par Hammerschmidt et al. (2009), l'effet de la stratégie du stade parasitaire non-infectieux sur les risques de prédation de son hôte a été mesuré.

Le second chapitre de cette étude traite de la nature de la relation entre l'hôte et son parasite pendant la phase de croissance du stade parasitaire non-infectieux. Si ce stade protège son hôte intermédiaire de forts risques de prédation, les « intérêts » du parasite et de son hôte en termes d'augmentation de l'aptitude phénotypique sont-ils réellement alignés ? Sommes-nous, pendant la phase non-infectieuse, en présence d'une forme de mutualisme transitoire, ou existe-t-il pour l'hôte des coûts directs (dus à l'infection *stricto sensu*) ou indirects (liés aux changements comportementaux induits par le parasite) spécifiques à l'infection par le stade non-infectieux du parasite ? Pour mesurer les coûts indirects potentiels, l'effet de l'utilisation d'un refuge par les hôtes intermédiaires infectés et sains sur leur comportement d'approvisionnement et la quantité de nourriture ingérée a été évalué. Puis, pour déterminer la présence de coûts directs à l'infection, les coûts physiologiques liés à l'infection par un stade non-infectieux ont été estimés par la quantification relative des réserves énergétiques (sucres simples, glycogène et lipides) des hôtes intermédiaires infectés et sains. Enfin, l'effet de l'infection par un stade non-infectieux du parasite sur le comportement de mise en couple des gammares mâles a été testé. Ces données rassemblées permettent de caractériser les coûts potentiels liés à l'infection par le stade non-infectieux du parasite, et donc de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'un mutualisme transitoire entre l'hôte intermédiaire et son parasite.

Enfin, le troisième et dernier chapitre de ce travail concerne le conflit intraspécifique pour la manipulation de l'hôte entre les stades infectieux et non-infectieux du parasite, lorsque ces deux stades de maturités différentes partagent le même hôte intermédiaire au même moment. Contrairement aux études s'intéressant aux conflits interspécifiques, celles portant sur les conflits intraspécifiques sont d'autant plus rares qu'elles concernent les parasites manipulateurs. L'objectif a donc été d'évaluer la manipulation du comportement de l'hôte

intermédiaire lorsque ce dernier est sain ou infecté par un ou deux stades infectieux *versus* un stade non-infectieux et un stade infectieux. L'hypothèse de travail repose sur la sélection, chez le stade non-infectieux, d'une stratégie de sabotage de la manipulation induite par le stade infectieux du parasite.

Cette étude s'achèvera sur une discussion générale regroupant les nouvelles données sur la stratégie du stade non-infectieux du parasite. Je conclurai quant aux origines évolutives potentielles de cette stratégie, ainsi qu'à ses conséquences à la fois pour ses conspécifiques et pour l'hôte intermédiaire. Enfin, je discuterai brièvement de l'implication de ces travaux dans un contexte écologique.

Modèle biologique

Le parasite acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis*

Modèle biologique

1. Les parasites acanthocéphales : généralités

Les acanthocéphales sont des organismes exclusivement endoparasites appartenant à un petit phylum monophylétique constitué d'un millier d'espèce environ (Amin 1985, Kennedy 2006). Ces helminthes sont caractérisés par une forte uniformité de structure : concernant les structures internes, ils sont tous dépourvus de système digestif et sont surtout caractérisés par un fort dimorphisme sexuel (les mâles ont notamment des glandes à ciment utilisées pour boucher les voies génitales femelles après la copulation et ainsi éviter la compétition spermatique, Crompton 1985). Les acanthocéphales ne possèdent pour seules structures « dures » que leur proboscis portant des crochets leur permettant de s'implanter dans la paroi intestinale de l'hôte définitif. Leur nombre et leur forme varient fortement d'une espèce à une autre, rendant leur identification systématique basée sur des différences morphologiques possible (figure 1, voir Monks 2001). Les études les plus récentes se basent, cependant, sur des différences génétiques pour établir une classification fiable du phylum des acanthocéphales (figure 2, voir notamment Verweyen et al. 2011 et Near 2002 pour une synthèse des études jusqu'aux années 2000). Il est aujourd'hui couramment admis que les acanthocéphales sont un groupe phylogénétiquement proche de celui des rotifères (Garey et al. 1996).

Les différentes espèces d'acanthocéphales possèdent des cycles de vie assez similaires : tous ont un stade de vie libre, l'œuf (contenant la larve appelée acanthor), ont besoin d'un arthropode comme hôte intermédiaire dans lequel ils passent par les stades larvaires acanthelle (non-infectieux pour l'hôte définitif) et cystacanthé (infectieux pour l'hôte définitif), et utilisent un vertébré comme hôte définitif dans lequel ils deviennent adultes et se reproduisent de façon sexuée (figure 3, Kennedy 2006). Les acanthocéphales partagent tous une stratégie d'exploitation de l'hôte bien particulière : au stade cystacanthé (infectieux pour l'hôte définitif), ils sont capables de manipuler le comportement et/ou l'apparence de leur hôte intermédiaire, leur permettant ainsi d'accroître leur chances de transmission vers l'hôte définitif (Moore 1984).

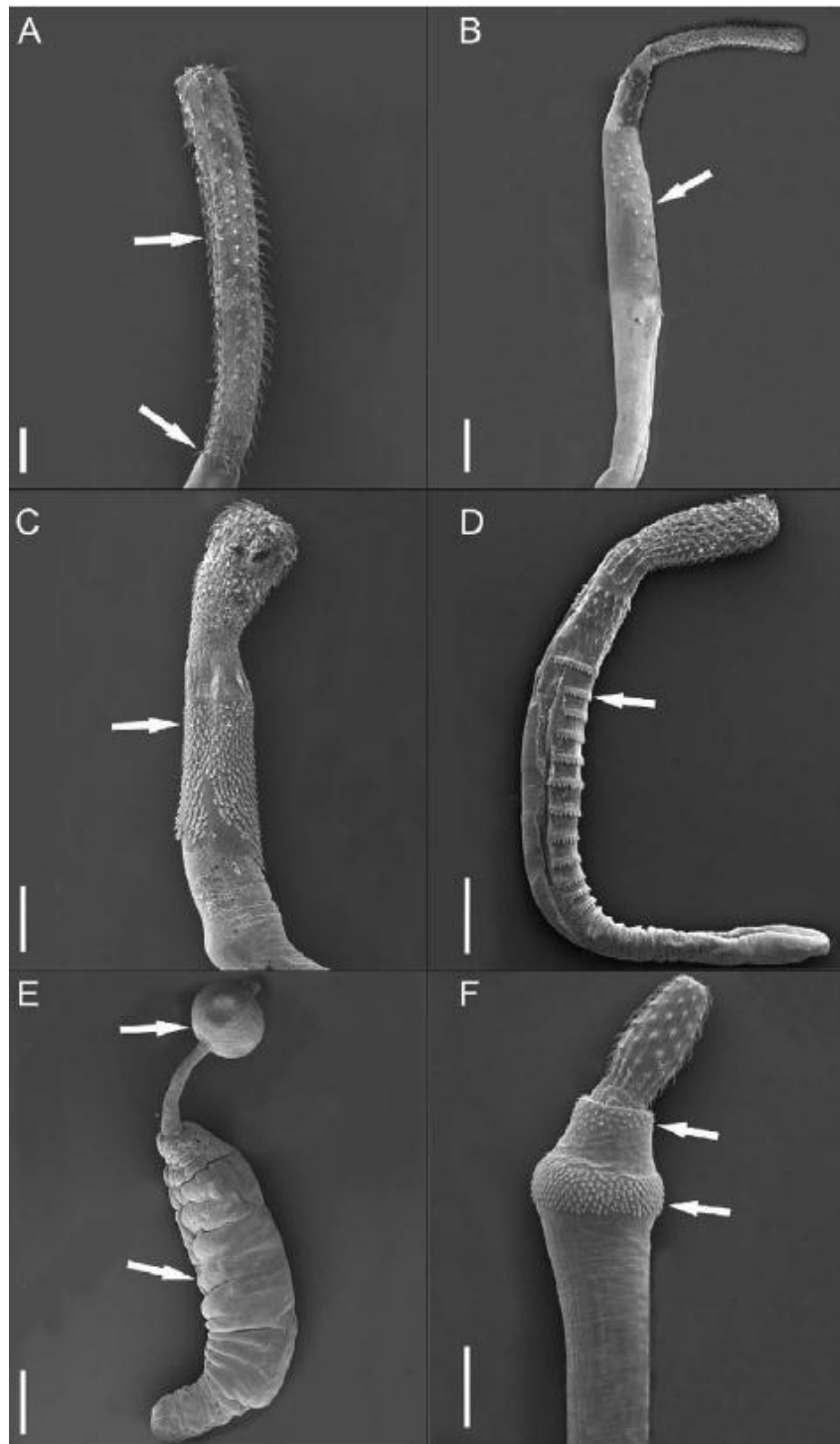


Figure 1. Variété de l'emplacement et du nombre d'épines chez les adultes de 6 espèces d'acanthocéphales. A : *Rhadinorhynchus pristis*, B : *Rhadinorhynchus lintoni*, C : *Gorgorhynchoides golvani*, D : *Serrasentis sagittifer*, E : *Pomphorhynchus laevis*, F : *Bolbosoma vasculosum* (échelles : A = 400 μm ; B, C, D, F = 200 μm ; E = 100 μm). D'après Verweyen et al. (2011).

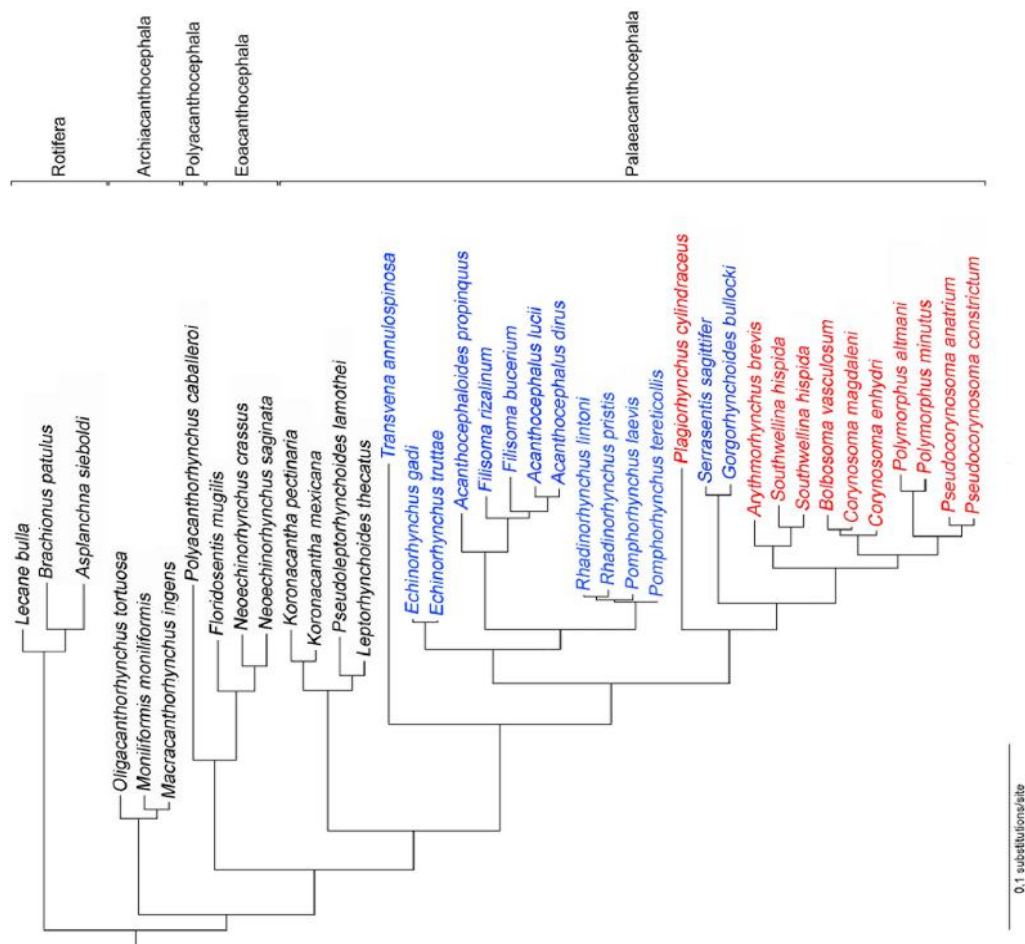


Figure 2. Arbre phylogénétique consensus obtenu par inférence bayésienne des relations entre espèces acanthocéphales, basé sur des données de la petite sous-unité de l'ADN ribosomal. Les ordres des Echinorhynchidés (bleu) et des Polymorphidés (rouge) ont un arrangement paraphylétique au sein de la classe des Palaeacanthocephala. D'après Verweyen et al. (2011).

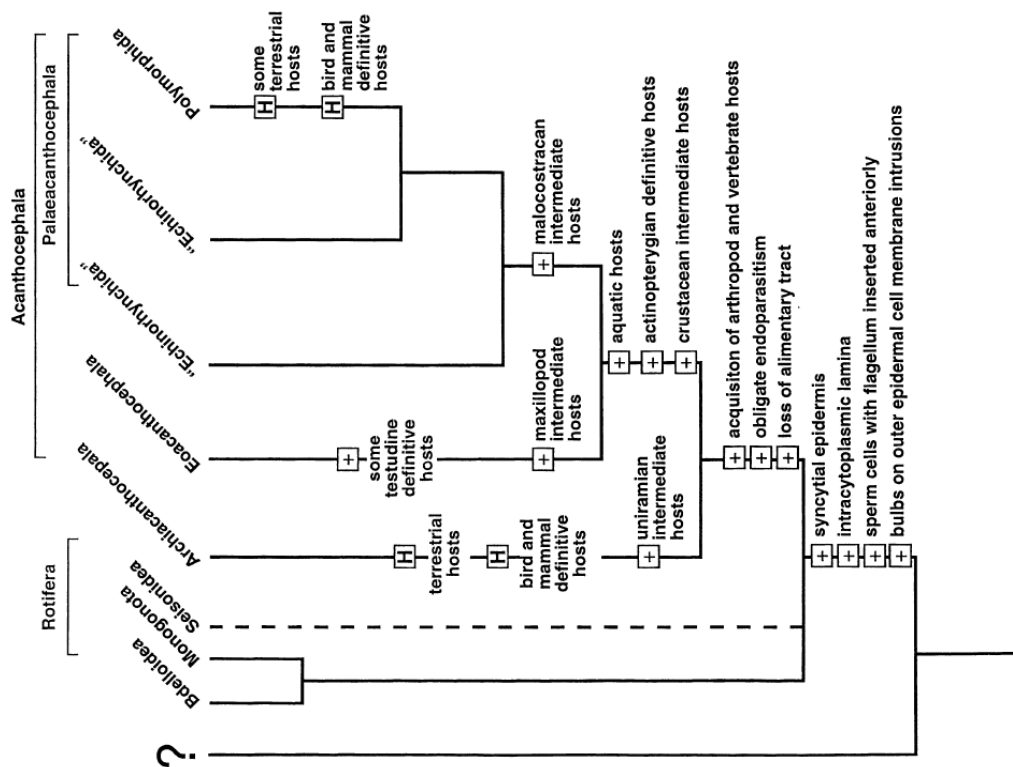


Figure 3. Optimisation des caractéristiques de l'hôte et de l'habitat basée sur la phylogénie des acanthocéphales inférée de l'ARNr 18S.
+ : caractères uniques. H : caractères homoplasiques. D'après Near (2002).

2. *Pomphorhynchus laevis* : cycle de vie et caractéristiques biologiques au sein de ses deux hôtes

Pomphorhynchus laevis est un parasite acanthocéphale appartenant à la classe des Palaeacanthocephala et à l'ordre des Echinorhynchidés, se caractérisant notamment par un hôte intermédiaire crustacé et un hôte définitif poisson (figures 2 et 3). *P. laevis* infecte donc deux hôtes au cours de son cycle de vie (voir figure 4). Les œufs, libres dans le cours d'eau, sont constitués d'une larve appelée acanthor et d'une enveloppe protectrice d'environ 100 µm. Ils sont ingérés par un amphipode d'eau douce tel que le gammare *Gammarus pulex*, hôte intermédiaire du parasite. Dans son hôte intermédiaire, l'acanthor perd son enveloppe protectrice puis traverse la paroi digestive, pour se développer ensuite dans la cavité générale (Taraschewski 2000).

Durant son développement dans le gammare, le parasite passe par différents stades larvaires. Le premier, aussi appelé stade « acanthelle », est caractérisé par la non-infectivité du parasite pour son hôte définitif. En effet, les structures internes de l'acanthelle de *P. laevis* ne sont pas définitives. Par exemple, chez les acanthocéphales, le proboscis et les crochets qui le constituent, permettant au parasite adulte de s'implanter dans la paroi intestinale de l'hôte définitif, ne se forment qu'à la fin du développement de l'acanthelle (Schmidt 1985). Il est alors impossible pour l'acanthelle de s'établir dans un hôte définitif. L'ingestion accidentelle d'un gammare parasité par le stade acanthelle de *P. laevis* aboutit donc irrémédiablement à la mort du parasite. Le passage par divers degrés de développement du stade acanthelle de *P. laevis* dans le gammare peut durer de 8 à 12 semaines, en fonction des conditions biotiques (e.g. présence de conspécifiques) et abiotiques (e.g. saison) (Franceschi et al. 2008 et 2010, respectivement). Ce long développement aboutit à la formation du stade cystacanthé, infectieux pour l'hôte définitif. A ce stade, le parasite a l'apparence d'une sphère mesurant environ 1 mm de diamètre et son anatomie est complète, lui permettant de s'établir dans un hôte définitif. Ce passage de l'hôte intermédiaire à l'hôte définitif nécessite l'ingestion du premier par le dernier (transmission trophique). Comme nous l'avons vu auparavant, de nombreux risques pour le parasite sont associés au passage d'un hôte à un autre. Ces risques sont contrecarrés par la sélection de diverses altérations du comportement du gammare, induites par le cystacanthé de *P. laevis*, et lui permettant d'accroître ses chances de prédation par des hôtes définitifs (voir Bakker et al. 1997 et Kaldonski et al. 2007 pour des démonstrations au laboratoire ; voir Lagrue et al. 2007a pour une évidence *in natura*). Les manipulations comportementales induites par le cystacanthé de *P. laevis* comprennent

l'inversion de la photophobie naturelle des gammarus sains en une forte photophilie (Kennedy et al. 1978, Bakker et al. 1997, Bauer et al. 2000, Cézilly et al. 2000, Perrot-Minnot 2004), la diminution de l'utilisation de refuges (Kaldonski et al. 2007), l'attraction par une odeur de prédateur (Kaldonski et al. 2007) et la prévalence accrue des gammarus infectés dans la dérive par rapport aux gammarus sains (McCahon et al. 1991, Lagrue et al. 2007a). L'ensemble de ces altérations revient à diminuer les défenses anti-prédateurs de l'hôte, ce qui les rend par ailleurs également sensibles à des prédateurs non-hôtes (Kaldonski et al. 2008). Aucune altération du comportement des gammarus infectés par une acanthelle de *P. laevis* n'avait été recherchée avant le début de ce travail, l'acanthelle n'étant pas suffisamment développée pour infecter un hôte définitif. Il a, par contre, été montré que l'altération de la photophobie ne s'exprime que lorsque *P. laevis* a atteint le stade cystacanthé (Franceschi et al. 2008). En ce qui concerne le développement du parasite, il est communément admis que le stade cystacanthé ne se développe plus et entre dans une sorte de « dormance » en attendant sa transmission (Schmidt 1985 ; voir Ball et al. 2008 et Parker et al. 2009c pour la notion de Growth Arrest at Larval Maturity, ou GALM). De la même façon que l'ingestion par un hôte intermédiaire donne le signal à l'acanthor de sortir de son enveloppe pour continuer son développement, c'est l'ingestion du cystacanthé par un hôte définitif adéquat qui indique au parasite la poursuite de son développement jusqu'à atteindre le stade adulte. Il est utile de noter que les gammarus peuvent être infectés par plusieurs cystacanthés de *P. laevis*, et que *P. laevis* peut même co-infecter un amphipode avec une autre espèce d'acanthocéphale (voir Franceschi et al. 2008 et Cézilly et al. 2000, respectivement). Enfin, précisons que d'autres espèces d'amphipodes, comme l'espèce invasive *Gammarus roeseli*, sont naturellement infectées par *P. laevis*. L'infection de *G. roeseli* par *P. laevis* induit une intensité de manipulation comportementale de l'hôte moindre que dans l'association *P. laevis* – *G. pulex* (Bauer et al. 2000).

De nombreux poissons d'eau douce ont été décrits comme hôtes définitifs potentiels de *P. laevis* (Kennedy 2006). En Bourgogne, les plus fortes prévalences et charges parasitaires de *P. laevis* ont été rencontrées chez le chevesne, *Leuciscus cephalus* (M.-J. Perrot-Minnot, communication personnelle). Lors de l'ingestion d'un gammarus infecté par un chevesne, le parasite s'implante dans la paroi intestinale de son hôte définitif grâce à son proboscis pourvu de crochets (figure 1), et peut alors achever sa maturation jusqu'à l'âge adulte. A la fin de sa maturation, l'adulte mesure de 0,5 à 1 cm. Les parasites mâles et femelles (généralement plus grands que les mâles) se reproduisent de façon sexuée, les œufs matures étant relâchés par les femelles dans la lumière du tube digestif de l'hôte et évacués

dans le cours d'eau avec les fèces du poisson. Enfin, *P. laevis* peut également infecter des poissons qui lui servent d'hôtes paraténiques (Médoc et al. 2011), et est capable de transmission post-cyclique (entre deux hôtes définitifs, Kennedy 1999).

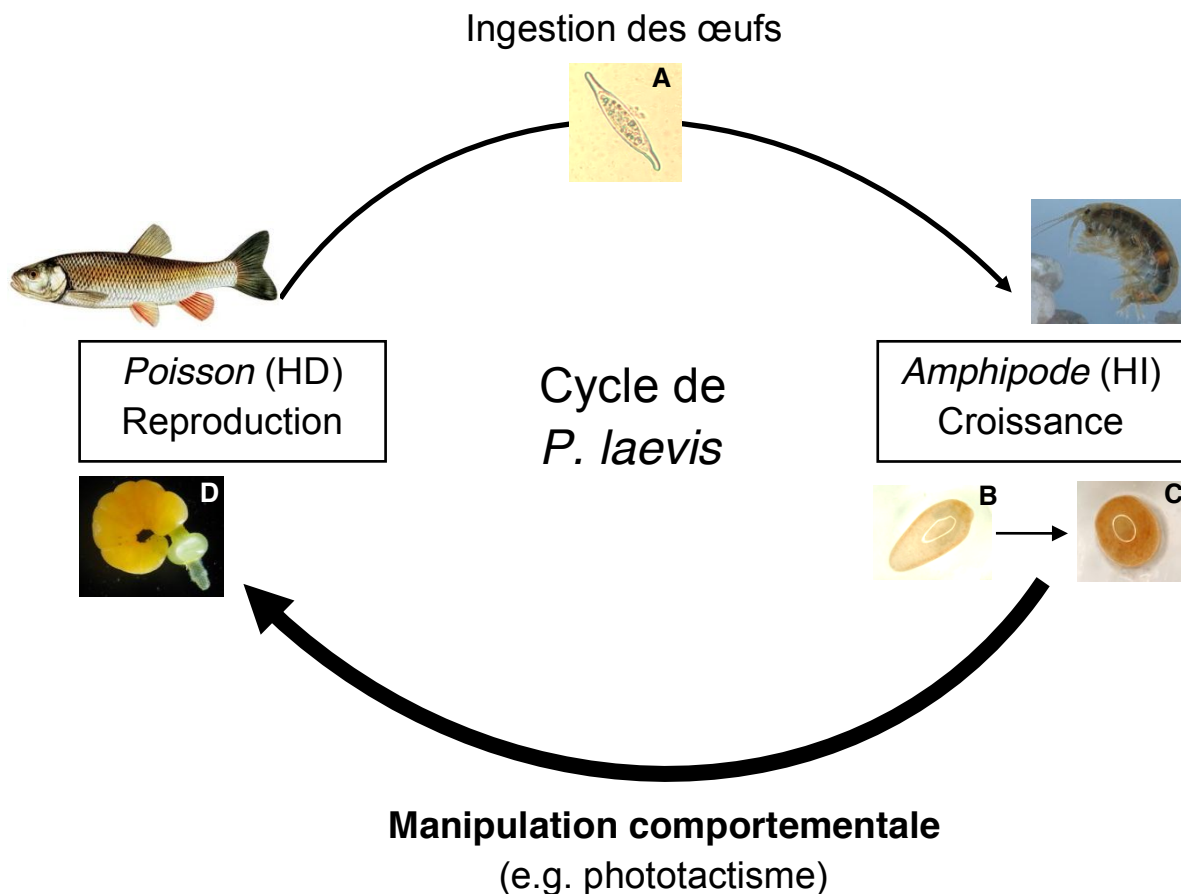


Figure 4. Cycle de vie de *Pomphorhynchus laevis*. Les œufs (A), stade de vie libre, sont ingérés par l'hôte intermédiaire amphipode (HI), dans lequel le parasite passe par les stades larvaires acanthelle (B, non-infectieux pour l'hôte définitif) et cystacanthe (C, infectieux pour l'hôte définitif). Au stade cystacanthe, *P. laevis* manipule le comportement de son HI, augmentant ainsi la probabilité de prédation de l'HI infecté par l'hôte définitif poisson (HD). Dans le poisson, le parasite devient adulte (D) et se reproduit. Les œufs de *P. laevis* sont ensuite libérés dans l'environnement avec les fèces du poisson.

Chapitre 1

Effets de l'acanthelle de *Pomphorhynchus laevis*
sur les défenses anti-prédateurs et
la probabilité de prédation de son hôte intermédiaire

Chapitre 1

L'objectif de ce premier chapitre était de tester l'hypothèse d'une stratégie de suppression de la prédation chez l'acanthelle de *Pomphorhynchus laevis*, au sens proposé par Parker et al. (2009c). Nous avons infecté expérimentalement des gammares de l'espèce *Gammarus pulex* par l'ingestion d'œufs de *P. laevis*. Des gammares témoins ont subi le même traitement, bien que n'ayant pas été mis en contact avec les œufs de parasite.

Une fois le stade acanthelle détecté chez les gammares, nous avons analysé le comportement anti-prédateur des gammares témoins et infectés par une acanthelle *via* des tests d'utilisation de refuge, en environnement neutre (i.e. sans indices de prédateur) et signé par des indices de prédateur. La même expérience a été réalisée sur les gammares infectés, cette fois-ci, par des cystacanthes (provenant de la même infestation expérimentale) afin de contrôler pour le pouvoir manipulateur des parasites utilisés lors de l'infestation expérimentale (voir Franceschi et al. 2010 et Dianne et al. 2012 (annexe 2) pour la variation de la manipulation de l'hôte gammaridé selon les origines de parasites *P. laevis*). L'utilisation plus ou moins intense d'un refuge en conditions stressantes ou non nous donne une première information quant à l'existence d'une stratégie de suppression de la prédation, comme ceci a été démontré par Hammerschmidt et al. (2009). Dans cette étude, nous sommes allés cependant plus loin en démontrant l'effectivité du lien entre, d'une part, la protection exercée par l'acanthelle de *P. laevis* et, d'autre part, la moindre probabilité de prédation des gammares infectés par une acanthelle, par rapport aux gammares témoins. Nous avons ainsi mis en évidence le caractère avantageux, pour le parasite, d'une protection exercée par les acanthelles vis-à-vis du risque de prédation de son hôte. De la même manière, la valeur adaptative de la manipulation comportementale du gammare induite par le cystacanthé, qui avait déjà été prouvée auparavant (Bakker et al. 1997, Kaldonski et al. 2007, Lagrue et al. 2007a), a été vérifiée dans cette étude.

Article 1

Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Gaillard, M., Léger, E. & Rigaud, T. 2011. Protection first then facilitation: a manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. *Evolution* **65**: 2692-2698.

PROTECTION FIRST THEN FACILITATION: A MANIPULATIVE PARASITE MODULATES THE VULNERABILITY TO PREDATION OF ITS INTERMEDIATE HOST ACCORDING TO ITS OWN DEVELOPMENTAL STAGE

Lucile Dianne,^{1,2} Marie-Jeanne Perrot-Minnot,¹ Alexandre Bauer,¹ Mickaël Gaillard,¹ Elsa Léger,¹
and Thierry Rigaud¹

¹Université de Bourgogne, Laboratoire Biogéosciences, UMR CNRS 5561, Equipe Ecologie Evolutive, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

²E-mail: lucile.dianne@u-bourgogne.fr

Received January 25, 2011

Accepted March 31, 2011

Data Archived: Dryad doi:10.5061/dryad.jc86t

Many trophically transmitted parasites with complex life cycles manipulate their intermediate host behavior in ways facilitating their transmission to final host by predation. This facilitation generally results from lowering host's antipredatory defenses when the parasite is infective to the final host. However, a recent theoretical model predicts that an optimal parasitic strategy would be to protect the intermediate host from predation when noninfective, before switching to facilitation when the infective stage is reached. We tested this hypothesis in the fish acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* using the amphipod *Gammarus pulex* as intermediate host. Gammarids parasitized by noninfective stage of *P. laevis* (acanthella) hid significantly more under refuges than uninfected ones. In addition, acanthella-infected gammarids were less predated upon by trout than uninfected ones. As predicted, a switch toward decreased antipredatory behavior of *G. pulex* and enhanced vulnerability to predation was found when *P. laevis* reached the stage infective to its final host. The parasites appear to be able to exploit plasticity in host antipredatory responses, and shift the host optimal response toward their own optimal balance.

KEY WORDS: Behavioral switch, intermediate host protection, parasite manipulation, *Pomphorhynchus laevis*, predation enhancement, predation suppression.

In parasites with multihost life cycles, completion of the life cycle critically relies on several transmission steps. Strategies to enhance transmission probability between successive hosts have arisen several times in different lineages of parasites, particularly in trophically transmitted parasites (i.e., those transmitted through predation of infected intermediate hosts by definitive hosts) (Chubb et al. 2010). Spectacular examples are known where parasite larvae change the behavior of their intermediate hosts, in ways increasing their vulnerability to predation by the definitive host, hence their transmission (see Moore 2002 for a review). Most

of the time, there is a match between the parasite developmental stage and the onset of this so-called behavioral manipulation: changes in behavior appear in the intermediate host when the parasite reaches the stage infective to a definitive host. Before this stage, the parasite larvae invest mainly in growth during what we could call a "noninfective phase." This phase is characterized by the parasite's inability to establish in the definitive host (see Nickol 1985 for a review on acanthocephalan parasites), and many studies have shown that none of the changes in host phenotype facilitating parasite's transmission are observable at this phase

(e.g., Seppälä et al. 2005; Franceschi et al. 2008). Therefore, until reaching the infective stage, parasite growth and survival contribute the most to future transmission chances.

Parasite survival in intermediate host depends on several factors related to host exploitation, but first of all on survival of the host itself. Decreasing predation risks of the intermediate host thus seems a basic way for a noninfective larva to increase its fitness. In a recent theoretical model, Parker et al. (2009) showed that a parasite strategy that induces a switch from “predation suppression” (during non infective phase) to “predation enhancement” (as soon as the infective stage is reached) in the intermediate host is selectively advantageous. Parker et al. (2009) even emphasize the fact that “predation suppression” should evolve more easily than “predation enhancement,” especially because the former does not need to be host-specific contrary to the later.

This model has some empirical support in trophically transmitted parasites. Hammerschmidt et al. (2009) showed that copepods infected by the noninfective stage of the cestode *Schistocephalus solidus* increased their recovery time after a shock and decreased their general activity, two behaviors presumably reducing predation risk. As soon as the parasite reached its infective stage, a behavioral switch was observed, possibly increasing vulnerability to predation. Reductions of risky behavior have also been found in vector-borne parasites (although this transmission mode does not involve predation of one host by another). Parasites of both human and avian malaria change the behavior of their mosquito vector before reaching the infective stage, in a way supposedly reducing their contact with vertebrates and possibly increasing the vector survival (respectively, Anderson et al. 1999; Koella et al. 2002). These studies shed light on protective behavior of hosts parasitized by immature parasite stages, but they did not directly address whether such protective behavior translates into decreased mortality risks. Yet, this demonstration remains essential to conclude to adaptive protection by noninfective parasites (Cézilly et al. 2010).

This study aimed at investigating if the noninfective stage of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* induces protective behavior in its intermediate host. *Pomphorhynchus laevis* is a trophically transmitted parasite that uses freshwater fish as definitive hosts (Kennedy 2006). In the fish intestine, the adult parasite sexually reproduces and eggs are released in the environment with fish faeces. Freshwater amphipods (e.g., *Gammarus pulex*) become infected by ingesting eggs. Larvae then enter the host's hemocoel and grow, reaching successively several larval stages: the acanthella stages (noninfective to definitive host) and the cystacanth stage (infective to definitive host). *Pomphorhynchus laevis* cystacanth induces a range of behavioral alterations in its gammarid host: it reverses the natural photophobia of infected *G. pulex* (Franceschi et al. 2008) and lowers the level of refuge use in the presence of a predator (Kaldonski et al. 2007). Gammarids in-

fectured by cystacanth are more preyed upon than uninfected ones (Kaldonski et al. 2007; Lagrue et al. 2007), in agreement with the “predation enhancement” criterion of parasite manipulation (Parker et al. 2009). But does acanthella change the behavior of the intermediate host in ways increasing protection and hence “predation suppression”? Franceschi et al. (2008) showed that gammarids infected with acanthella were as photophobic as uninfected ones. However, because the photophobia was maximal for uninfected gammarids (they already spend all their time in the dark), this protective behavior could not be stronger in animals infected by acanthella. A recent study nevertheless showed that an acanthella coinfecting a *G. pulex* with a conspecific cystacanth partially prevents or delays the manipulation of phototaxis (Dianne et al. 2010). The acanthella stage is therefore not just a “passive passenger” in a coinfecting host, but another criterion than host phototaxis is needed to evidence its putative protective effect when alone.

Using experimental infections of *G. pulex* by *P. laevis*, to control for parasite stages, we compared levels of refuge use between uninfected gammarids, gammarids infected by *P. laevis* acanthellae, and gammarids infected by cystacanths, using a microcosm experiment. Then, we carried out predation tests to compare the relative susceptibility to predation of acanthella-infected gammarids compared with uninfected ones, and of cystacanths-infected gammarids compared with uninfected ones. Following the model of Parker et al. (2009), we predict that *P. laevis* acanthellae should enhance the anti-predatory behavior of *G. pulex* and make gammarids less vulnerable to predation than uninfected ones. Once the cystacanth stage is reached, there should be a switch from strong anti-predatory behavior to low anti-predatory behavior and from predation suppression to predation enhancement.

Material and Methods

BIOLOGICAL MATERIAL AND EXPERIMENTAL INFECTION

Experimentally infected *G. pulex* were used in both the refuge use experiment and the predation test in microcosm. Uninfected *G. pulex* were collected in a small tributary of the Suzon River, Burgundy, eastern France (47°24'13.91"N; 4°53'00.54"E). Yearling brown trout (*Salmo trutta fario*, 10–15 cm) from a commercial fishery were used to provide olfactory cues in refuge use experiments, and as predator in predation experiments. This fish was recorded as a suitable definitive host for *P. laevis* (Kennedy 2006). Before experiments, trout were fed regularly with uninfected *G. pulex*.

Ten gravid *P. laevis* females were collected in intestine of chubs (*Leuciscus cephalus*), from naturally infected fish caught in the river Vouge, Burgundy (47°9'34.36"N; 5°9'2.50"E).

Molecular identification of parasites and exposure of *G. pulex* to parasite eggs were performed following the procedure of Franceschi et al. (2008). A total of 2515 *G. pulex* (1574 males and 941 females) were exposed to parasite eggs. *Gammarus pulex* unexposed to parasite eggs, but handled and maintained under the same conditions as the exposed ones, were used as controls. Uninfected gammarids thereby provided controls matching the age of acanthella-infected gammarids and, later, of cystacanth-infected gammarids. About six weeks after exposure, the acanthella could be spotted through host cuticle (translucent light-orange and shapeless larval stage). A first series of behavioral experiments was made within 24 h of acanthella detection. Some infected gammarids were kept until parasite grown to the cystacanth stage, for a second series of behavioral experiments serving as positive controls for parasite manipulation (Kaldonski et al. 2007, 2009). These last experiments were performed two weeks after the cystacanth stage had been reached.

BEHAVIORAL MEASUREMENTS

Refuge use

Refuge use was recorded in a microcosm, with or without olfactory cues from a fish predator. Trout-conditioned water was obtained by isolating individually three trout for 24 h in a small aquarium (24 × 16 × 15 cm) filled with 250 mL of treated tap water per fish centimetre (Kaldonski et al. 2007). The experimental arena for refuge use consisted of an aquarium (32 × 20 × 20 cm) filled with 8 L of treated tap water and surrounded by opaque screens. The refuge consisted of a piece of air-brick (21.5 × 10 × 5 cm) where gammarids could shelter, following Kaldonski et al. (2007). For each trial, 10 gammarids of similar infection status (acanthella-infected, cystacanth-infected, or uninfected) were introduced in the aquarium. After a 10-min acclimatization period, the number of individuals outside the refuge (from 0 to 10) was recorded every 30 sec for 5 min. The 10 numbers were then summed, to get a total score for the experiment ranging from 0 (high refuge occupancy) to 100 (no refuge use). This first sequence gave the ‘basal level’ of refuge use by gammarids. We then added 100 mL of trout-conditioned water (by mixing 3 × 33 mL of water conditioned by individually isolated trout) in half of trials, and 100 mL of control water in the other half. After a 5-min acclimatization period, the number of individuals seen outside the refuge was recorded as described above. Controls using age-matched uninfected gammarids (see above) were run at the same time as infected ones.

Predation tests

The selectivity of trout toward infected or uninfected gammarids was assessed in a microcosm, providing the same refuges as the ones used for ‘refuge use’ experiment, following the procedure of Kaldonski et al. (2007). Predation tests were performed

with 40 male gammarids in two independent sets of experiments: ‘acanthella trials’ (14 replicates, with 14 acanthella-infected and 26 uninfected gammarids, the latter being more prevalent in the field than the former, Lagrue et al. 2007) and ‘cystacanth trials’ (10 replicates, with 14 cystacanth-infected and 26 uninfected gammarids). The duration of cystacanth trials was 90 min (following Kaldonski et al. 2007) whereas the duration of acanthella trials was increased to 180 min, because we noticed in preliminary experiments that the number of eaten gammarids was about three times lower in trials involving acanthellae than in trials involving cystacanths. At the end of each trial, remaining gammarids of each type (infected or uninfected ones) were counted. To be able to analyze predation bias statistically, only replicates where more than six prey and less than 25 prey were eaten were kept for analyses (Manly 1974; Chesson 1978; Kaldonski et al. 2007).

STATISTICAL ANALYSES

Scores of refuge use (the cumulative proportion of gammarids seen outside the shelter) were arcsine-transformed to meet normality and homoscedasticity conditions. We performed a repeated measure analysis of variance (ANOVA) to compare scores of acanthella-infected and uninfected gammarids before and after water injection. Because of a small number of replicates, comparisons of levels of refuge use between cystacanth-infected and uninfected gammarids were realized using two-tailed Mann–Whitney U-tests and Wilcoxon signed-rank tests. We used Cohen’s *d* effect statistics to quantify the ‘parasite stage’ size effect on refuge use in the presence of predator cues. Ninety-five percent confidence intervals (hereafter named 95% CI) of Cohen’s *d* values were calculated (Nakagawa and Cuthill 2007).

Following Kaldonski et al. (2007, 2009), predation bias toward one of the two types of prey (acanthella-infected vs. uninfected or cystacanth-infected vs. uninfected gammarids) was estimated using Manly’s selectivity index for variable prey population (α_i), which is appropriate when prey cannot be replaced (Manly 1974; Chesson 1978). Index values could range from 0 (when only uninfected prey are eaten) to 1 (when only infected prey are eaten). We assessed selective predation on infected or uninfected prey using a one-tailed *t*-test to the specified value of $\alpha = 0.5$ (meaning no predation bias toward one type of prey or another) (Sokal and Rohlf 1995). Bootstrapped 95% CI were calculated to provide additional information concerning the significance of the effect. In addition, because predation rate appeared to vary with the type of trial run (‘acanthella’ vs. ‘cystacanth’), we compared the number of prey eaten per unit of time between these two types of trials using a *t*-test (Sokal and Rohlf 1995).

Statistical analyses were performed using JMP software version 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA), except bootstrapped 95% CI that were calculated using R software version 2.11.1 (R Development Core Team, www.r-project.org).

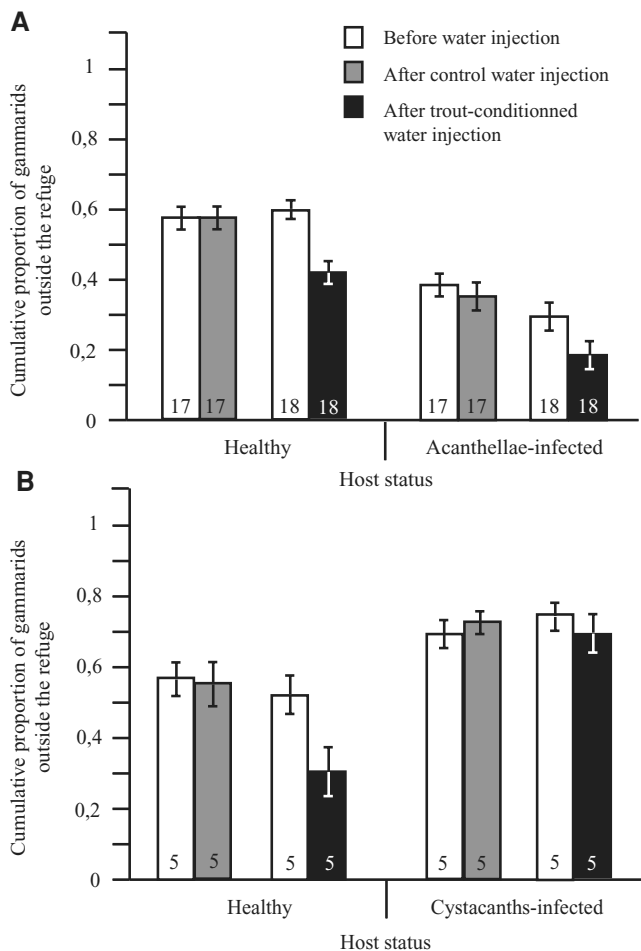


Figure 1. Effects of host status and type of injected water on the level of refuge use by *Gammarus pulex* infected by *Pomphorhynchus laevis* acanthella (A) or cystacanth (B) compared to uninfected hosts (means $\pm$ SEM). Level of refuge use is represented by the cumulative proportion of gammarids seen outside the refuge. Numbers in the bars refer to number of replicates in each category (each replicate was pooling 10 gammarids).

Results

REFUGE USE

Acanthella-infected gammarids showed a greater level of refuge use than uninfected gammarids (Fig 1A and Table 1). Moreover, gammarids that received trout-conditioned water in their aquarium presented a greater level of refuge use than gammarids that received control water (Fig 1A and Table 1). Finally, the cumulative proportion of gammarids seen out of the refuge was higher for males than for females (males: mean $\pm$ SEM = 0.47 ± 0.03 , $N = 40$; females: mean $\pm$ SEM = 0.36 ± 0.04 , $N = 30$; Table 1). None of the interactions between host status, injected water status, and host sex was significant (Table 1). Gammarids responded to the injection of trout-conditioned water by significantly enhancing refuge use, whereas their behavior

Table 1. Results of the repeated measures ANOVA analyzing the intensity of refuge use in acanthella-infected and uninfected hosts. Nonsignificant interactions have been retrieved from the model. The analyses were made on arcsine-square root transformed data.

	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i> -value
Between subjects			
All between	19.24	3,66	<0.0001
Host status	41.42	1,66	<0.0001
(acanthella-infected vs. uninfected)			
Injected water status	7.29	1,66	0.008
(trout-conditioned vs. control)			
Host gender (male vs. female)	8.48	1,66	0.004
Intra subjects			
All intrainteractions	8.38	3,66	<0.0001
Reaction to water injection	26.68	1,66	<0.0001
(before vs. after)			
Reaction to water injection $\times$ host status	1.31	1,66	0.256
Reaction to water injection $\times$ injected water status	21.47	1,66	<0.0001
Reaction to water injection $\times$ host gender	2.86	1,66	0.095

was not significantly changed by the injection of control water (Table 1 and Fig. 1A). Acanthella-infected and uninfected *G. pulex* displayed the same pattern of refuge use after water injection (Table 1 and Fig 1A). The hiding behavior of gammarids after the addition of water did not change according to host gender (Table 1).

Despite the small number of replicates, we found an opposite pattern of refuge use by cystacanth-infected gammarids, in agreement with Kaldonski et al. (2007). Cystacanth-infected gammarids used significantly less the refuge than uninfected gammarids, both before and after injection of trout-conditioned water (Mann–Whitney U-tests: $\chi^2 = 4.84$, $P = 0.03$, and $\chi^2 = 5.31$, $P = 0.02$ respectively; Fig. 1B). Moreover, the cumulative proportion of cystacanth-infected gammarids seen outside the refuge was not significantly reduced after injection of trout-conditioned water, in contrast to uninfected hosts (Wilcoxon signed-rank test: $P = 0.08$ and $P = 0.01$ respectively; Fig 1B). The magnitude of acanthella-induced and cystacanth-induced behavioral alteration, estimated by Cohen's *d* effect statistic, was similar although in opposite direction ($d = -5.01$, 95% CI = -6.38 to -3.64 for acanthella-infected gammarids; $d = 4.81$, 95% CI = 2.04 – 7.59 for cystacanth-infected gammarids).

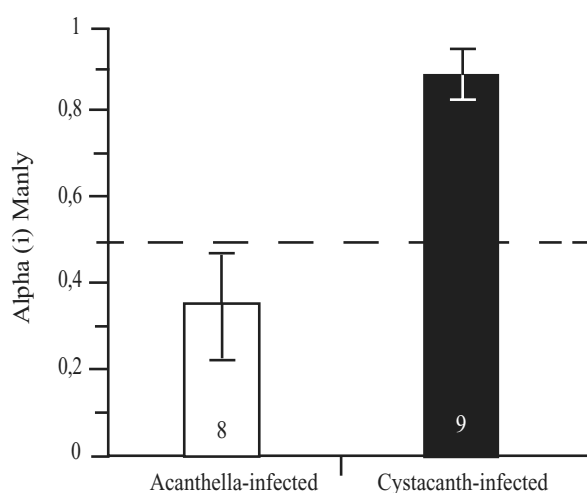


Figure 2. Manly's alpha (true means $\pm$ 95%CI) representing selective predation of brown trout on *G. pulex* infected by *P. laevis* acanthella versus uninfected *G. pulex* (white bar), and cystacanth-infected *G. pulex* versus uninfected *G. pulex* (black bar). The dotted line indicates no predation bias toward one of the two types of prey. A value above the dotted line means selective predation on infected prey, whereas a value below means selective predation on uninfected prey. The number of replicates in each type of trial is indicated at the bottom of the bars. [Correction made June 1, 2011 after Online publication: In the first version of this article, legend of Table 1 was incorrectly appended at the end of the legend of Figure 2. This has been corrected.]

PREDATION TESTS

Acanthella-infected gammarids were significantly less predated upon by trout than uninfected ones (t -test to a specified value: $N = 8$, $t_7 = -2.13$, $P = 0.035$; Fig. 2). By contrast, cystacanth-infected gammarids were more predated upon than uninfected ones (t -test to a specified value: $N = 9$, $t_8 = 11.5$, $P < 0.0001$; Fig. 2). These significant results were complemented by bootstrapped 95% CI that did not cross the " $\alpha = 0.5$ " line, neither in acanthella trials (95% CI = 0.22–0.47) nor in cystacanth trials (95% CI = 0.82–0.95). The number of total gammarids eaten per unit of time in acanthella trials was significantly lower than in cystacanth trials (mean $\pm$ SEM: 3.75/h $\pm$ 0.65 vs. 12.15/h $\pm$ 0.62, respectively) (t -test: $t_{15} = 9.28$, $P < 0.0001$). Consequently, only eight trout of 14 ate more than six prey in acanthella trials, whereas all the 10 trout consumed more than six prey in the cystacanth trials.

Discussion

Any strategy diminishing the mortality risk of intermediate host is expected to be selected in parasites before they reach transmission stage, because it increases their own survival and time frame for growth (Parker et al. 2009). As predicted by this "protective

strategy," gammarids infected with *P. laevis* acanthella were found more often under refuge than uninfected gammarids. This was true regardless of the presence of predator olfactory cues. In addition, acanthella-infected gammarids and uninfected ones responded similarly to the olfactory cues from a predator by enhancing refuge use. Thus, acanthella tend to reinforce a protective behavior in its intermediate host—sheltering under a refuge—independently of predation risk. Moreover, acanthella-infected gammarids were significantly less preyed upon by trout than uninfected ones when both types of prey were offered. By contrast, cystacanth-infected gammarids displayed a lower level of refuge use and experienced a higher predation rate than uninfected ones, in agreement with a previous study (Kaldonski et al. 2007). Therefore, there was a switch from enhanced to decreased refuge use, and from decreased to increased susceptibility to predation, between the acanthella and the cystacanth stages infecting *G. pulex*. This switch coincided with a life-history switch from investment in growth and survival to investment in transmission (Parker et al. 2009). Following Poulin (2010), we can thus consider this parasite strategy of "protection first then facilitation" as optimal in terms of parasite growth and transmission, hence fitness. Interestingly, the magnitude of changes in antipredatory defenses induced by acanthella or cystacanth was similar (although in opposite directions). The acanthella-induced "protective strategy" should thus be considered with as much importance as cystacanth-induced facilitation of predation. In showing that the acanthella is affecting host behavior, this study complements previous observation that *P. laevis* acanthella diminishes or delays the reversal of phototaxis induced by a coinfecting cystacanth (Dianne et al. 2010). Supposedly protective behavior has already been reported in other nonmature parasites (Anderson et al. 1999; Koella et al. 2002; Hammerschmidt et al. 2009). However, this is the first study, to our best knowledge, showing that such behavioral changes do indeed increase parasite survival, a necessary criterion to assign an adaptive value to this protective strategy (by analogy to facilitation by the infective stage, Cézilly et al. 2010).

The existence of a "predation suppression" strategy in *P. laevis* acanthellae may have several ecological and/or evolutionary outcomes. From an ecological point of view, the role of manipulative parasites in community ecology is more and more emphasized, in particular by strengthening trophic links (Lefèvre et al. 2008). Our study and previous ones (Hammerschmidt et al. 2009; Parker et al. 2009) call for a full consideration of the entire parasite life cycle in modeling the impact of trophically transmitted parasites on community network and food chain. From an evolutionary point of view, the net fitness effect of infection by a manipulative parasite on its intermediate host fitness should be reconsidered by including the acanthella-induced

predation suppression. Costs of cystacanth-induced behavioral manipulation on host fitness are obvious because it increases predation probability (Kaldonski et al. 2007; Lagrue et al. 2007). More balanced costs and benefits may arise from the protective strategy of the acanthella on its intermediate host. Increasing survival to predation risk is a shared interest between *P. laevis* acanthella and its host, and could compensate the physiological costs of parasite growth on host survival (Franceschi et al. 2010). However, we showed that the refuge use by acanthella-infected gammarids is higher than the refuge use by uninfected ones, regardless of predation risk. This reflects a departure from an optimal activity level, which could potentially impact the host fitness, by decreasing for example food provisioning and/or mating success. In crustaceans, reduced activity in the presence of predator olfactory cues reduces the food uptake (Short and Holomuzki 1992) and the probability of breeding pair formation (Dunn et al. 2008). In agreement with such a trade-off between sheltering and searching for mates, we found that refuge use by *G. pulex* males was lower than refuge use by females. *Pomphorhynchus laevis* parasites may therefore indirectly suffer from their host's suboptimal activity. Whether such potential indirect costs are outweighed by the benefits from predation suppression awaits further investigation.

This work brings novel perspectives to behavioral manipulation studies by demonstrating that a manipulative parasite protects its intermediate host from predation, as long as it is noninfective for definitive host. Uninfected *G. pulex* display behavioral plasticity according to predation risk, as shown by their context-dependent sheltering behavior. *Pomphorhynchus laevis* acanthella seems to be able to exploit this plasticity and shift its host optimal response toward its own optimal balance. According to Parker et al. (2009), the host protective strategy should evolve in noninfective stages of trophically transmitted parasites more readily than facilitation by infective stages through behavioral manipulation. Indeed, a protective strategy does not need to specifically target a suitable next host to benefit the parasite, as much as facilitation by host behavioral manipulation does (see however Seppälä and Jokela 2008). Despite this apparent readiness to evolve, our study is one of the rare studies that has addressed this topic yet, and little is known about the ubiquity of protective strategies in trophically transmitted parasites (Parker et al. 2009; Chubb et al. 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

LD benefited from a doctoral grant co-funded by the CNRS and the Conseil Régional de Bourgogne. This work was supported by the ANR (grant BLAN07-3_183300) and by the Conseil Régional de Bourgogne (grant 9201AAO040S00619) to TR and MJPM. We thank Sébastien Motreuil for technical assistance during field samplings and Matthias Galipaud for essential help with statistics software.

LITERATURE CITED

- Anderson, R. A., J. C. Koella, and H. Hurd. 1999. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266:1729–1733.
- Cézilly, F., F. Thomas, V. Médoc, and M.-J. Perrot-Minnot. 2010. Host-manipulation by parasites with complex life-cycles: adaptive or not? *Trends Parasitol.* 26:311–317.
- Chesson, J. 1978. Measuring preference in selective predation. *Ecology* 59:211–215.
- Chubb, J. C., M. A. Ball, and G. A. Parker. 2010. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends Parasitol.* 26:93–102.
- Dianne, L., T. Rigaud, E. Léger, S. Motreuil, A. Bauer, and M.-J. Perrot-Minnot. 2010. Intraspecific conflict over host manipulation between different larval stages of an acanthocephalan parasite. *J. Evol. Biol.* 23:2648–2655.
- Dunn, A., J. T. A. Dick, and M. J. Hatcher. 2008. The less amorous *Gammarus*: predation risk affects mating decisions in *Gammarus duebeni* (Amphipoda). *Anim. Behav.* 76:1289–1295.
- Franceschi, N., A. Bauer, L. Bollache, and T. Rigaud. 2008. The effects of parasite age and intensity on variability in acanthocephalan-induced behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* 38:1161–1170.
- Franceschi, N., S. Cornet, L. Bollache, F. X. Dechaume-Moncharmont, A. Bauer, S. Motreuil, and T. Rigaud. 2010. Variation between populations and local adaptation in acanthocephalan-induced parasite manipulation. *Evolution* 64:2417–2430.
- Hammerschmidt, K., K. Koch, M. Milinski, J. C. Chubb, and G. A. Parker. 2009. When to go: optimization of host switching in parasites with complex life cycles. *Evolution* 63:1976–1986.
- Kaldonski, N., M.-J. Perrot-Minnot, and F. Cézilly. 2007. Differential influence of two acanthocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Anim. Behav.* 74:1311–1317.
- Kaldonski, N., M.-J. Perrot-Minnot, R. Dodet, G. Martinaud, and F. Cézilly. 2009. Carotenoid-based colour of acanthocephalan cystacanths plays no role in host manipulation. *Proc. R. Soc. Lond. B* 276:169–176.
- Kennedy, C. R. 2006. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Koella, J. C., L. Rieu, and R. E. L. Paul. 2002. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behav. Ecol.* 13:816–820.
- Lagrue, C., N. Kaldonski, M.-J. Perrot-Minnot, S. Motreuil, and L. Bollache. 2007. Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* 88:2839–2847.
- Lefèvre, T., C. Lebarbenchon, M. Gauthier-Clerc, D. Missé, R. Poulin, and F. Thomas. 2008. The ecological significance of manipulative parasites. *Trends Ecol. Evol.* 24:41–48.
- Manly, B. F. J. 1974. A model for certain types of selection experiments. *Biometrics* 30:281–294.
- Moore, J. 2002. *Parasites and the Behavior of Animals*. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Nakagawa, S., and I. C. Cuthill. 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol. Rev.* 82:591–605.
- Nickol, B. B. 1985. Epizootiology. Pp. 307–346 in D. W. T. Crompton and B. B. Nickol, eds. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.

- Parker, G. A., M. A. Ball, J. C. Chubb, K. Hammerschmidt, and M. Milinski. 2009. When should a trophically transmitted parasite manipulate its host? *Evolution* 63:448–458.
- Poulin, R. 2010. Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked question. *Adv. Stud. Behav.* 41:151–186.
- Seppälä, O., and J. Jokela. 2008. Host manipulation as a parasite transmission strategy when manipulation is exploited by non-host predators. *Biol. Lett.* 4:663–666.
- Seppälä, O., A. Karvonen, and E. T. Valtonen. 2005. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Anim. Behav.* 70:889–894.
- Short, T. M., and J. R. Holomuzki. 1992. Indirect effects of fish on foraging behaviour and leaf processing by the isopod *Lirceus fontinalis*. *Fresh. Biol.* 27:91–97.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry*. 3rd ed. W. H. Freeman, New York.

Associate Editor: A. Read

Chapitre 2

Mutualisme ou parasitisme ?

Quantification des coûts potentiels à l'infection par une
acanthelle de *P. laevis* pour son hôte intermédiaire

Chapitre 2

A. Effets de l'infection par une acanthelle de *P. laevis*, et de l'utilisation de refuges accrue chez son hôte, sur l'approvisionnement et l'état des réserves énergétiques de *G. pulex*.

Nous avons précédemment montré que l'acanthelle de *P. laevis* protège son hôte intermédiaire, l'amphipode *G. pulex*, du risque de prédation, augmentant ainsi ses propres chances de survie jusqu'à atteindre le stade infectieux. Cette protection passe notamment par l'augmentation de l'utilisation de refuge par l'hôte. D'un point de vue évolutif, l'existence d'une stratégie protectrice induite par l'acanthelle de *P. laevis* implique de reconsidérer l'ensemble de la balance coûts-bénéfices subie par l'hôte, et par extension par le parasite. Comme exposé en introduction, l'apparent alignement des intérêts de l'hôte et du parasite peut révéler l'existence d'un mutualisme transitoire. Il est à présent essentiel de rechercher l'existence de coûts potentiels directement liés à l'infection par une acanthelle, ou plus indirectement liés à l'utilisation de refuges accrue par les gammarés infectés par une acanthelle. L'existence de coûts pour le gammaré, par exemple sur la prise alimentaire ou sur la reproduction, impliquerait que les intérêts des deux protagonistes ne seraient pas totalement alignés, laissant supposer que la protection de l'hôte exercée par l'acanthelle est davantage bénéfique à cette dernière qu'à son hôte.

Dans ce second chapitre, nous nous sommes attachés à évaluer les coûts potentiels liés à l'infection par une acanthelle de *P. laevis* et/ou à l'utilisation accrue de refuges sur la prise alimentaire et les réserves énergétiques des hôtes (ce sous-chapitre), ainsi que sur leur reproduction (le sous-chapitre suivant). Dans cette première section, à l'aide d'infestations expérimentales de *G. pulex* par des œufs de *P. laevis*, nous avons mesuré dans un premier temps l'intensité d'utilisation de refuges d'amphipodes infectés par une acanthelle de *P. laevis*, par rapport aux amphipodes non-infectés. Des mesures similaires ont été effectuées chez des gammarés parasités par des cystacanthes, le stade larvaire infectieux pour l'hôte définitif poisson, nous fournissant ainsi un contrôle de l'induction de la manipulation comportementale par les familles de parasites utilisées lors de l'infestation. Dans un second temps, dans le même dispositif, nous avons évalué la prise alimentaire des gammarés infectés et non-infectés. Les expériences se sont déroulées en présence ou en absence de signaux de prédateur dans l'environnement, et la nourriture était disposée à l'intérieur ou à l'extérieur du

refuge, poussant le gammare à explorer son environnement pour se nourrir. Enfin, nous avons quantifié les réserves énergétiques des hôtes (lipides, sucres et glycogène), dans l'optique d'obtenir une mesure fiable de l'état physiologique de l'hôte intermédiaire selon son statut infectieux.

Dans un dispositif où les gammarès étaient seuls (i.e. où la tendance grégaire des gammarès ne pouvait influencer le comportement individuel (Kullmann et al. 2008), par opposition aux expériences menées dans le chapitre précédent), les résultats ont confirmé que les gammarès parasités par une acanthelle de *P. laevis* utilisent davantage les refuges que les gammarès sains. Plus précisément, seuls les gammarès sains utilisaient moins leur refuge lorsque la nourriture était disposée hors de celui-ci, un comportement contexte-dépendant que n'ont pas montré les gammarès parasités par une acanthelle. Ensuite, les gammarès parasités par une acanthelle ont montré une prise alimentaire moindre que les gammarès sains. Ici encore, la prise alimentaire était contexte-dépendante uniquement chez les gammarès sains, ceux-ci mangeant davantage lorsque la nourriture était disposée à proximité (sous le refuge) et lorsqu'un signal de prédateur était présent dans leur environnement. Cependant, le lien potentiel entre l'utilisation du refuge et la prise alimentaire des gammarès n'a pu être mis en évidence dans cette expérience. Enfin, les gammarès infectés par une acanthelle de *P. laevis* et les gammarès sains ont montré des quantités similaires de réserves énergétiques, quelles qu'elles soient (lipides, sucres libres et glycogène). Aucune déplétion énergétique ou, à l'inverse, augmentation des réserves énergétiques liées au statut infectieux des hôtes n'a, à ce stade du développement parasitaire, été démontrée.

Ces résultats indiquent que les hôtes infectés (et par conséquent les acanthelles), ne semblent pas subir d'effets négatifs liés à l'utilisation accrue de refuges ou simplement à l'infection sur leur état physiologique (quantité d'énergie disponible), et ce malgré une prise alimentaire globalement moindre chez les gammarès parasités. Le comportement d'exploration réduit des gammarès infectés, dû à l'utilisation de refuges accrue, suffit alors potentiellement à la conservation de bonnes réserves énergétiques. Hôtes comme parasites semblent donc bénéficier de l'infection en termes de survie augmentée vis-à-vis de la prédation, sans coût physiologique apparent.

La survie accrue des gammarès infectés par une acanthelle, i.e. leur comportement d'exploration réduit, pourrait alors être perçue comme étant une réponse compensatoire de l'hôte suite à la baisse de motivation pour se nourrir potentiellement induit par l'acanthelle de *P. laevis*. En effet, si cette baisse du niveau d'exploration permet à l'hôte de conserver un état physiologique satisfaisant et, par conséquent, d'avoir une survie (voire une reproduction)

accrue, son aptitude phénotypique se verrait augmentée par rapport à une situation où son comportement d'exploration resterait identique à celui des hôtes sains. L'induction d'une baisse de motivation pour la prise de nourriture par l'acanthelle pourrait alors être vue comme une stratégie d'exploitation des réponses compensatoires de l'hôte.

Article 2

Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Guvenatam, A. & Rigaud, T.
Investigations of foraging and physiological costs resulting from parasite-induced host protection against predation.

Investigations of foraging and physiological costs resulting from parasite-induced host protection against predation

L. DIANNE, M.-J. PERROT-MINNOT, A. BAUER, A. GUVENATAM & T. RIGAUD

UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

Abstract

Many trophically-transmitted parasite larvae actively manipulate their intermediate host behaviour in ways increasing its transmission probabilities to the next host in their life cycle. Only stages infective for the next host alter host behaviour in such a way. Before reaching infectivity, parasite larvae grow into several larval stages in the intermediate host, all being non-infective for the next (or definitive) host. Since early predation of the infected intermediate host results in parasite death, non-infective larval stages are predicted to increase their host survival, thus their own survival until infectivity, by enhancing hosts anti-predatory defences. Such a protective strategy has been demonstrated in an acanthocephalan parasite. However, the host may also suffer this increase of anti-predatory defences. For instance, this could divert infected hosts from their optimal balance between survival and seeking for food or mating opportunities. In this study, we tested the hypothesis of such trade-off in freshwater amphipods (*Gammarus pulex*), intermediate hosts of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis*. *P. laevis* acanthella (the non-infective stage of the parasite) is known to enhance refuge use of *G. pulex*, which decrease amphipods risks of being predated. During behavioural experiments, we measured refuge use and food intake of acanthella-infected hosts, in presence or absence of predator cues in the water. Food was deposited inside or outside the refuge, mimicking different intensity of host food foraging. Energetic reserves of amphipods were then quantified. We found that acanthella-infected amphipods did use more refuges and eat less than uninfected hosts. Whether the important refuge use or the acanthella infection was the cause of this reduced food intake was however unclear according to our results. Despite a reduced food intake, acanthella-infected hosts were not depleted in energetic reserves. Therefore, amphipods did not suffer from acanthella infection or refuge use, and could even benefit from these behavioural changes. We discuss these results from an

evolutionary point of view, suggesting that absence of changes in energy reserves of acanthella-infected hosts could be due to compensatory responses to the infection.

Keywords: Behavioural manipulation, host protection, non-infective parasite, refuge use, food intake, energetic reserves, *Pomphorhynchus laevis*, *Gammarus pulex*.

Introduction

Among complex life cycle parasites, trophically-transmitted helminths need to be transmitted from intermediate to definitive hosts by the ingestion of the former by the latter. This requirement led to the selection, in parasites, of strategies of intermediate host exploitation favouring parasite transmission (Lafferty 1999, Chubb et al. 2010). For instance, many trophically-transmitted parasites are able to manipulate the behaviour of their intermediate host in ways increasing host probability of being eaten by a suitable host, thus enhancing their own transmission probability (see Moore 2002 for a review). A few studies noted that these singular changes in host behaviour does occur only when the parasite larva is infective for the next host in the life cycle, a condition that Poulin (1995) first made unavoidable to conclude for the adaptive nature of observed changes in host behaviour. For instance, Bethel & Holmes (1974) noted that the cystacanth of the acanthocephalan parasite *Polymorphus paradoxus* modifies its amphipod intermediate host behaviour (reversed phototaxis, skimming on the surface of water and clinging to floating objects) but only when it is infective for the bird definitive host. A similar observation has been noted in the fish acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* (Franceschi et al. 2008), as well as in cestodes (Poulin et al. 1992), trematodes (McCarthy et al. 2000, Seppälä et al. 2005) and protozoans of the genus *Plasmodium* (Anderson et al. 1999, Koella et al. 2002). Before being infective, parasite larva grows, and generally reaches several larval stages until infectivity for the next host in the life cycle. These larval stages are not sufficiently developed morphologically and physiologically to establish in the next host; as a consequence, at this developmental stage, predation of the infected intermediate host leads to parasite death (e.g. Schmidt 1985 and Taraschewski 2000 for a detailed description of larval acanthocephalans development). Therefore, to increase its fitness, the best strategy for a non-infective parasite would be to increase its own survival until the infective stage, by enhancing intermediate host survival. At the opposite of intermediate host manipulation by infective parasite *stricto sensu* (where host anti-predator defences are decreased), this “protective strategy” could involve an enhancement of host anti-predator defences, thus diminishing its risk of being predated (Parker et al. 2009). A parasite variant that is first able to protect its host against predation risks when non-infective, before manipulating its host behaviour in ways increasing its probability to be transmitted, should be selected relatively to a variant inducing no change in its host before reaching infectivity.

To date, only one study evidenced that host protection diminished host predation risk compared to uninfected individuals (Dianne et al. 2011). The amphipod *Gammarus pulex*, intermediate host of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*, showed an increase of refuge use when infected with the non-infective stage of the parasite (acanthella). This behaviour decreased its probabilities to being predated by a fish definitive host. When the parasite became infective for the fish, *G. pulex* showed a behavioural switch, from protection to exposure, thus increasing the probability of *P. laevis* transmission to the fish (Dianne et al. 2011). This temporary host protection seemed to result from a parasite adaptation allowing an increase of its overall fitness during its whole development, since it matched parasite “interests” at each developmental stage. Moreover, because of a decreased mortality risk, it seems that such protection also fits intermediate host “interests”, at least temporarily.

As suggested by Parker et al. (2009) and Dianne et al. (2011), a parasite-induced protection of the host could divert host behaviour from its optimum. Particularly, the balance between survival and seeking for food or reproductive partners could be impacted. According to life history theory, resources allocation to a particular trait of the organism (such as survival) potentially prevents from allocating more resources to another trait (such as reproduction). The balance of resources allocation between traits that results in the higher organism fitness should therefore be selected. Parasites are known to influence life history traits of their hosts; for instance, hosts that cannot prevent infection often reduce survival costs of parasitism by altering their reproductive physiology and behaviour, in a way that increases their reproductive output (see a review in Agnew et al. 2000). Thus, fitness of infected hosts is lower than that of uninfected ones, but higher than if they had not plastically modified their life history traits. In the case of a host protected by the non-infective stage it harbours, host survival is enhanced by increasing anti-predatory defences. If host survival trades-off with reproduction or feeding behaviour, infection could decrease host fitness (*i*) in a behavioural way, either by reducing its encounters of reproductive partners or its feeding activity, and/or (*ii*) physiologically, by decreasing host energetic reserves that could in turn impact host survival and/or reproduction. Despite the decreased predation rate, infection by a non-infective stage would therefore be costly, possibly decreasing host fitness and leading to host-parasite conflict (Schwartz & Koella 2001). At the opposite, infected hosts might take advantage of an increased survival to enhance their reproduction, and thus increase their fitness. This host strategy is defined as a compensatory response to parasitism, and could even be exploited by parasites to enhance their own transmission chances if host behavioural changes also benefit the parasite (Lefèvre et al. 2008).

In this study, we tested the hypothesis of a trade-off between parasite-induced protection and host foraging behaviour for food, in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* infected with the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis*. *P. laevis* is a fish intestinal parasite at the adult stage. At larval stage, when infective for the fish definitive host, it manipulates its amphipod intermediate host behaviour in ways enhancing its transmission probabilities (Bakker et al. 1997, Kaldonski et al. 2007, Lagrue et al. 2007). Contrary to uninfected *G. pulex*, amphipods parasitized by a *P. laevis* cystacanth (the infective larval stage) are photophilic (Cézilly et al. 2000, Franceschi et al. 2008), are attracted by predator odours (Kaldonski et al. 2007), are showing decreased anti-predatory defences (high refuge use, Kaldonski et al. 2007, Dianne et al. 2011) and are frequently found drifting in the river (Lagrue et al. 2007). None of these behavioural alterations had ever been found in *G. pulex* infected with a *P. laevis* acanthella, the non-infective stage of the parasite (Franceschi et al. 2008, Dianne et al. 2011). Conversely, acanthella-infected amphipods increase their level of refuge use, which decrease their risk of being predated by a fish (Dianne et al. 2011). We hypothesized that (i) this high refuge use in acanthella-infected hosts is directly costly in terms of seeking for food (and thus food intake) and (ii) energetic reserves of acanthella-infected hosts should be depleted compared to uninfected hosts. To test these hypotheses, we performed experimental infections of *G. pulex* by *P. laevis* eggs. When acanthellae were developed, we performed behavioural experiments to test amphipod intensity of refuge use and estimate the amount of food eaten by hosts. These experiments were carried out in a context of high predation risk (water signed by predator cues) or low predation risk (neutral water), and with food provided inside or outside the refuge, this last context mimicking foraging behaviour from the host. We finally quantified energetic reserves (lipids, free sugars and glycogen) in infected *versus* uninfected amphipods to assess the potential energetic depletion of infected hosts.

Materials and Methods

Biological material and experimental infections

We performed two experimental infections of *Gammarus pulex* hosts with *Pomphorhynchus laevis* eggs, in order to obtain infected hosts staggered in time to carry out the experiments. Uninfected *G. pulex* amphipods were collected in February 2012 in a small tributary of the

Suzon River, Burgundy, eastern France (47°23'56.19"N; 4°50'31.13"E). *P. laevis* was never encountered in this host population, which we can consider naïve for this parasite. Only male gammarids were kept for the experiment, since failure in parasite development are more often seen in female gammarids (Franceschi et al. 2008). They were acclimated at the laboratory for 8 to 10 days before experimental infections under a 12:12 light:dark cycle, and fed during all the experiment with conditioned elm leaves (*Ulmus laevis*).

Adult *P. laevis* parasites were removed from the intestine of naturally infected chubs (*Leuciscus cephalus*) caught in February 2012 in the Vouge river (47°09'34.36"N; 5°09'02.50"E). Parasite eggs were collected by dissecting female *P. laevis*. Since another species of *Pomphorhynchus* parasites co-exist with *P. laevis* in this population of chubs, molecular identification of parasites was performed based on size polymorphism of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) rDNA gene, following Franceschi et al. (2008). 12 clutches (each clutch from a different female parasite) from 4 different fish were kept for the first experimental infection and 14 clutches from 4 different fish for the second one.

Experimental infections were carried out following the procedure of Franceschi et al. (2008) and Dianne et al. (2011). Briefly, male gammarids were allowed to feed during 48 hours on a 1 cm² piece of elm leaf, on which a parasite egg suspension of determined concentration was deposited. A total of 1480 male *G. pulex* were exposed to parasite eggs. 400 control gammarids, unexposed to parasite eggs, were handled and maintained in the same conditions as the exposed ones. From the sixth week after exposure, the presence of *P. laevis* acanthellae was checked once a week by inspecting gammarids through a dissecting microscope. Acanthellae (translucent light-orange and shapeless larval stage) can be detected through host cuticle. As soon as an acanthella was observed (after 10 ± 1 weeks post exposure), infected and control gammarids were isolated in a small dish (6 cm diameter) and deprived of food during 24 hours before behavioural experiments. Later in the experiment (after 14 ± 1 weeks), we followed the same protocol for cystacanth-infected gammarids (cystacanths being detected as opaque-orange and ball-shaped larval stages), in order to control for the effectiveness of cystacanth-induced behavioural manipulation of gammarids.

For behavioural experiments, we produced signed water, i.e. water containing predator cues. We kept at the laboratory, at 15±1°C under a 12:12 light:dark cycle, 12 young chubs of 15 cm each (caught in the Ouche river near Dijon, Burgundy) in a tank filled with 80 L of tap water previously dechlorinated, oxygenated and UV-treated. Each chub was weighted to determine a concentration of predator cues in the water. This concentration was fixed to 3 gram of fish per litre of water (it is worth noting that these concentrations were often variable

in previous studies, see for instance Mathis & Hoback 1997). The water from a similar tank, treated as previously described but without chubs, was used as control water.

Behavioural measurements

Activity

General activity of infected and control gammarids was recorded and analysed with ViewPoint software (Viewpoint Life Sciences, Inc. - 2010). Gammarids were placed individually in Petri dishes filled with either control water or signed water. After 2 minutes of acclimatization, distance covered by gammarids was recorded with an infrared camera during 5 minutes.

Foraging

Measurements of foraging behaviour began 1 hour after recordings of general activity. Infected and control gammarids were introduced individually in 0.5 L rectangular aquaria, identical to those in which gammarids were maintained at the laboratory during parasite development. Aquaria were filled with either control or signed water, each gammarid keeping the same water type during measurements of both activity and foraging. A dark and opaque refuge was placed at one end of each aquarium, covering about 30% of total aquarium area (see appendix 1 for a picture). At the other end, a wooden pick was placed so that we could hang food on it. Food consisted of two pieces of conditioned elm leaves ($\varnothing$ 1 cm² each) of known dry weight (prior to experiment, each leaf disc was dried at least two hours at 50°C, weighted to the nearest hundredth of a milligram and then re-hydrated for 24 hours to be used in the experiment).

Four different treatments were carried out in this experiment: food inside or outside the refuge, in the presence or in the absence of predator cues in the environment. After an acclimatization period of 30 minutes, refuge use by gammarids was checked every 10 minutes during 150 minutes. A score of 0 was given if the gammarid was inside the refuge and a score of 1 if it was found outside. For each gammarid, total score of refuge use therefore ranged between 0 (gammarid always inside the refuge) and 15 (gammarid always outside the refuge). Gammarids were then maintained in the aquarium during 24 hours, after which remaining leaves were dried and weighted (as described before), to determine the amount of food eaten by each gammarid. Gammarids were finally dissected and status of infection was confirmed. Parasites were removed and hosts were dried to determine their dry body mass to the nearest

hundredth of a milligram. Dry gammarids were then frozen at -80°C in a 1.5 mL Eppendorf tube for future biochemical analyses.

Quantification of energetic reserves

Quantification of energetic reserves of gammarids was adapted from Van Handel (1985a, 1985b) and Rivero & Ferguson (2003). Before quantification, energetic reserves had to be freed from gammarids bodies by dissolving them. Frozen gammarids were first crushed in their Eppendorf tube. 0.2 mL of 2% sodium sulphate solution and 0.75 mL of a 1:2 chloroform-methanol solution were added to the tube. After homogenization, tubes were stored at room temperature for 24 hours. Tubes were then centrifuged at 6000 rpm for 6 minutes to obtain the pellets of glycogen. Supernatants, which contained total lipids and free sugars (mono- and di-saccharides), were divided into two parts, each of these parts being transferred to a clean culture tube for lipid and sugars analyses.

For lipid analyses, culture tubes were placed inside a dry bath at 90°C until complete evaporation of the solvent. 0.2 mL of concentrated sulphuric acid (95%) was added to each tube and left for 10 minutes at 90°C. Tubes were then removed from the dry bath. 4.5 mL of Vanillin-phosphoric acid reagent (see Van Handel 1985b) was added to each tube, which were then vortexed and left to cool at room temperature. After 5 minutes during which colour developed, 0.1 mL of each tube was placed in a well of a 96 well micro-plate. Optical density in each well was read directly at 525 nm, using a spectrophotometer (SpectraMax Plus384 Absorbance Microplate Reader) and the software SoftMax Pro v5.2. Lipid contents in each sample were determined from a calibration curve constructed with samples from 8 to 500 µg of a commercial vegetable oil (Van Handel 1985b).

For sugars analyses, culture tubes were placed inside a dry bath at 90°C until complete evaporation of the solvent. 4.5 mL of Anthrone reagent (see Van Handel 1985a) were added to each tube before being placed at 90°C for 17 minutes. Tubes were then left to cool and vortexed. 0.1 mL of each tube was placed into a separate well of a 96 well micro-plate. Optical density in each well was read directly at 625 nm, using the same spectrophotometer and analyses software as in lipids analyses. Sugar contents in each sample were determined from a calibration curve constructed using samples from 13 to 800 µg of a standard glucose solution (Van Handel 1985a).

Finally, for glycogen analyses, the pellets were dissolved in 2 x 0.5 mL of Anthrone reagent, and then introduced in a clean culture tube. 3.5 mL of Anthrone reagent were added

to each culture tube before being placed at 90°C in a dry bath for 17 minutes. Tubes were then left to cool and vortexed. 0.1 mL of each tube was pipetted into a separate well of a 96 well micro-plate. Optical density in each well was read directly at 625 nm, using the same spectrophotometer and analyses software as in lipids and sugars analyses. Glycogen contents in each sample were determined from a calibration curve constructed with the same concentrations of a standard glucose solution as in sugar analyses.

Statistical analyses

Uninfected gammarids observed in acanthella trials and in cystacanth trials were two distinct sets of controls, because they were not maintained in the laboratory during the same time (controls for cystacanth infections were 4 weeks older than controls for acanthella infections). This allowed controlling the effect of the age of infection. We therefore analysed on the one hand “acanthella trials”, i.e. acanthella-infected hosts *versus* uninfected ones (the main objective of this study), and on the other hand “cystacanth trials”, i.e. cystacanth-infected hosts *versus* uninfected ones (the control of behavioural manipulation *sensu stricto*). Both acanthella and cystacanth trials were analysed with the same method explained hereafter.

For activity analyses, since distances covered by gammarids reach normality and homoscedasticity conditions, we performed two two-way ANOVAs (one for acanthella trials and one for cystacanth trials) to analyse the effects of infection status, environment (neutral or signed water) and their interaction on gammarids activity. Besides, correlation between activity and dry weight of gammarids was assessed doing a Spearman’s ρ test.

Scores of refuge use, which ranged between 0 and 15, were transformed in binomial (0/1) values to perform a generalized linear model. Since distribution of scores showed a median of 0, we assigned a score of 0 to gammarids that always stayed in the refuge (total refuge use score of 0), and a score of 1 to gammarids that were seen at least once outside the refuge (total refuge use score between 1 and 15). A logistic regression was performed to analyse the refuge use, with infection status (infected *vs.* uninfected), environment (presence *vs.* absence of predator cues), leaves position (inside *vs.* outside the refuge), gammarid dry weight and their interactions as potential explanatory factors. To assess the importance of an effect, we calculated effect sizes using Odd-Ratio index (OR) and its 95% confidence interval (CI) (Nakagawa & Cuthill 2007). OR ranges between 0 and $+\infty$ and is significant when 95% CI do not cross 1. It is important to note that analyses using untransformed data (i.e. scores from 0 to 15) provided essentially the same results than this logistic regression made on binomial data. However, because data distribution never met homoscedasticity conditions,

only non-parametric analyses were possible, and interactions between factors were impossible to test. We therefore choose to present the logistic regression analysis only.

Dry weights of eaten leaves were transformed using a BoxCox transformation to reach homoscedasticity conditions. A linear model (multi-factorial ANOVA) was performed to analyse the effect of infection status, environment, leaves position, gammarid dry weight and their interactions on the amount of eaten leaves. As previously seen, we assessed the importance of an effect calculating effect sizes. Here, we used bootstrapped Cohen's d with bootstrapped 95% CI (Nakagawa & Cuthill 2007). Cohen's d ranges between $-\infty$ and $+\infty$ and is significant when 95% CI do not cross 0.

Contrary to behavioural measurements, analyses of energetic reserves (lipids, sugars and glycogen contents) were carried out for both acanthella and cystacanth trials at the same time, to compare energetic reserves of the two types of infected gammarids to the two types of uninfected hosts. Since mean gammarid dry weight was different in the four parasitic status (infected and uninfected of both acanthella and cystacanth trials, ANOVA: $F_{3,147} = 3.741$, $P = 0.013$), we could not insert this variable as a co-variable in our model. For the same reasons, we did not work on residuals of the linear regression of energetic reserves by gammarid dry weight. We therefore analysed energetic reserves corrected individually by gammarid dry weight. We performed a MANOVA (Pillai's trace) to analyse the effects of infection status (infected *vs.* uninfected) and type of trial (acanthella *vs.* cystacanth) – plus their interaction – on the three types of energetic reserves (lipids, sugars and glycogen). Three subsequent two-way ANOVAs were then carried out to analyse the effects on each type of energetic reserves separately. Effect sizes were then calculated as seen before by using bootstrapped Cohen's d with bootstrapped 95% CI.

All analyses were performed with JMP 7.0.1 (SAS Institute Inc.), except calculations of bootstrapped Cohen's d which were performed with R 2.11.1 (R Development Core Team).

Results

Behavioural measurements

Acanthella trials

Acanthella-infected gammarids were (marginally) significantly less active than uninfected gammarids (Two-way ANOVA, effect of infection status: $F_{1,291} = 3.908$, $P = 0.049$; results

not shown). Gammarids detected predator cues in their environment since they were less active in signed water than in neutral water (Two-way ANOVA, effect of environment: $F_{1,291} = 4.745$, $P = 0.030$; results not shown). Both acanthella-infected and uninfected gammarids reacted to signed water by reducing their activity level (Two-way ANOVA, effect of interaction between infection status and environment: $F_{1,291} = 2.353$, $P = 0.126$; results not shown). Finally, covered distance was positively correlated with dry weight of gammarids (Spearman's ρ : $\rho = 0.141$, $P = 0.012$; results not shown).

Both acanthella-infected and uninfected gammarids used significantly more the refuge when predator cues were present in the environment, whatever the position of the food (table 1a, figure 1a). The size of this effect is important (Odd-Ratio (OR) = 0.147 [0.087; 0.247]). Acanthella-infected gammarids were more often found inside the refuge than uninfected ones (table 1a). This significant difference is mainly due to the fact that uninfected hosts used less the refuge when food was outside than when food was inside (table 1a, figure 1b). Again, the size of this effect is strong (OR = 2.471 [1.238; 4.933]). Acanthella-infected gammarids did not show such a differential behaviour (figure 1b).

Acanthella-infected gammarids ate less leaves than uninfected ones, a difference due to two factors. First, uninfected gammarids ingested more food when leaves were inside the refuge than when they were outside (table 1b, figure 2a; effect size: Cohen's $d = 0.501$ [0.162; 0.862]), a behaviour that acanthella-infected gammarids did not show (figure 2a). Second, uninfected hosts ate more leaves in the presence of predator cues in the environment than in the absence of these cues (table 1b, figure 2b). As previously, size effect is very significant ($d = -0.51$ [-0.888; -0.155]). Again, acanthella-infected gammarids did not show this differential behaviour (figure 2b). Finally, gammarids dry weight was positively correlated to dry weight of eaten leaves ($\rho = 0.122$, $P = 0.04$); the larger the gammarids, the more they ingested food (whatever their infection status, the environment or leaves position).

Table 1. Linear generalized model (logistic regression) analyzing the effects of infection status (acanthella-infected vs. uninfected hosts), environment (presence or absence of predator cues), leaves position (inside or outside the refuge), gammarid dry weight and their interactions on **(a)** refuge use ($R^2 = 0.179$) and **(b)** dry weight of eaten leaves ($R^2 = 0.129$). Non-significant interactions were removed from the model. Bold variables were significant.

Sources of variation	Likelihood ratio (a) or F-ratio (b)	P-value
<i>(a) Refuge use</i>	<i>69.557</i>	<i><0.0001</i>
Infection status	4.116	0.042
Environment	56.061	<0.0001
Leaves position	5.258	0.022
Gammarid dry weight	0.039	0.843
Infection status*Leaves position	4.401	0.036
<i>(b) Weight of eaten leaves</i>	<i>6.84 (6, 284)</i>	<i><0.0001</i>
Infection status	9.956 (1, 284)	0.002
Environment	5.571 (1, 284)	0.019
Leaves position	7.611 (1, 284)	0.007
Gammarids dry weight	4.585 (1, 284)	0.033
Infection status*Environment	10.659 (1, 284)	0.001
Infection status*Leaves position	4.162 (1, 284)	0.042

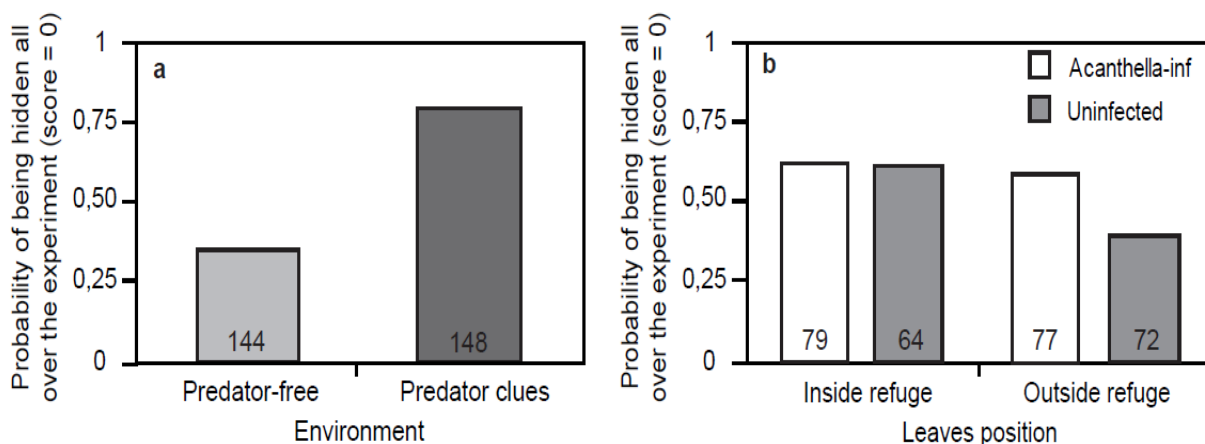


Figure 1. Refuge use of gammarids according to **(a)** the presence of predator cues in the environment and **(b)** the infection status and leaves position with regard to the refuge. Numbers in the bars are sample sizes.

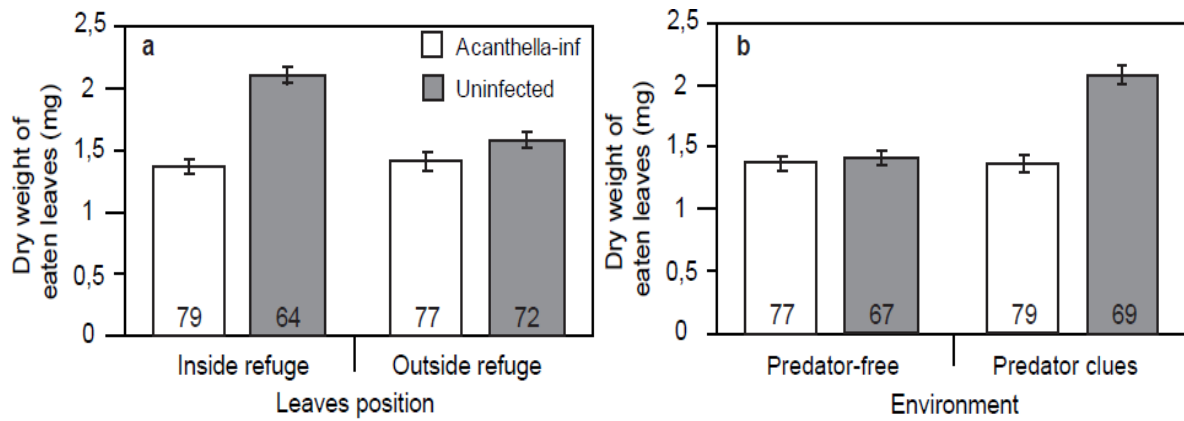


Figure 2. Dry weight of eaten leaves (means $\pm$ s.e.m.) in acanthella-infected and uninfected gammarids according to (a) the position of leaves with regard to the refuge and (b) the presence of predator cues in the environment. Numbers in the bars are sample sizes.

Cystacanth trials

Cystacanth-infected gammarids were as active as uninfected gammarids, although there was a non-significant tendency towards a higher activity of cystacanth-infected gammarids than that of uninfected ones (Two-way ANOVA, effect of infection status: $F_{1,74} = 3.239$, $P = 0.076$; results not shown).

Cystacanth-infected gammarids were more often found outside the refuge than uninfected ones (table 2a, figure 3a). It should be noted that, although marginally non-significant, the pattern of refuge use according to the presence of predator cues tended to be different between cystacanth-infected and uninfected gammarids (table 2a). Indeed, cystacanth-infected hosts were almost never found in the refuge whatever the presence of predator cues ($\chi^2 = 1.114$, $P = 0.291$), contrary to uninfected hosts which show a tendency to use more the refuge in signed water ($\chi^2 = 3.466$, $P = 0.062$). The fact that this was not significant (contrary to uninfected gammarids in acanthella trials) seemed only due to the small sample size ($N=30$). Finally, gammarids used more intensively the refuge when food was inside than when it was outside (table 2a, figure 3b), whatever their infection status or the environment. Regarding the consumption of leaves, cystacanth-infected hosts ate as much as uninfected ones whatever the external context, although a tendency towards a reduced consumption of cystacanth-infected hosts could be noted (but this was not significant, probably due to low sample sizes; table 2b). As in acanthella trials, gammarid dry weight was positively correlated to dry weight of eaten leaves ($\rho = 0.346$, $P = 0.002$).

Table 2. Linear generalized model (logistic regression) analyzing the effects of infection status (cystacanth-infected vs. uninfected hosts), environment, leaves position, gammarid dry weight and their interactions on (a) refuge use ($R^2 = 0.194$) and (b) dry weight of eaten leaves ($R^2 = 0.136$). Bold variables were significant.

Sources of variation	Likelihood ratio (a) or F-ratio (b)	P-value
<i>(a) Refuge use</i>	<i>18.228</i>	<i>0.003</i>
Infection status	5.962	0.015
Environment	0.457	0.499
Leaves position	5.079	0.024
Gammarid dry weight	0.946	0.331
Infection status*Environment	3.758	0.053
<i>(b) Weight of eaten leaves</i>	<i>2.757 (4, 74)</i>	<i>0.034</i>
Infection status	3.556 (1, 74)	0.063
Environment	1.294 (1, 74)	0.259
Leaves position	0.286 (1, 74)	0.594
Gammarid dry weight	6.906 (1, 74)	0.011

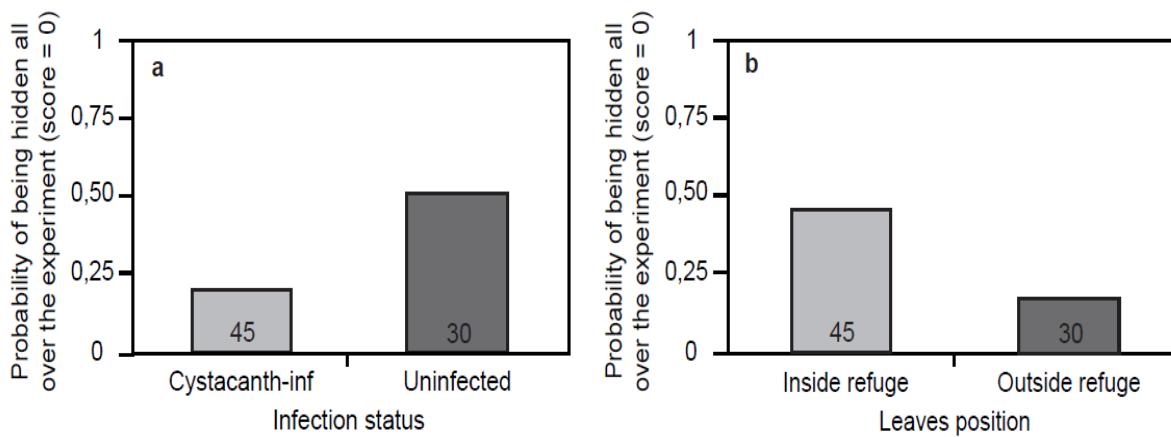


Figure 3. Refuge use of gammarids according to (a) the presence of predator cues in the environment and (b) leaves position with regard to the refuge. Numbers in the bars are sample sizes.

Quantification of energetic reserves

The general model indicates an effect of infection status and type of trials (i.e. the age of the infection) on energetic reserves of gammarids, but not their interaction (table 3a).

Lipids reserves were significantly different according to infection status (table 3b, figure 4a); infected hosts had significantly less lipids than uninfected ones, the size of this effect being important (Cohen's $d = -0.43 [-0.766; -0.103]$). While the interaction between trials and infection status was not significant in the ANOVA, Cohen's d analysis revealed differences in the effect size of the infection according to the trials. In acanthella trials, acanthella-infected hosts had as much lipids as uninfected ones ($d = -0.287 [-0.752; 0.171]$; figure 4a). However, a significant difference was seen in cystacanth trials where cystacanth-infected gammarids had significantly less lipids than uninfected ones, here again with an important effect size ($d = -0.617 [-1.1; -0.153]$; figure 4a).

Gammarids had identical sugars contents, whatever their infection status or the type of trial (table 3c, figure 4b).

Finally, glycogen reserves were significantly different according to infection status (table 3d, figure 4c); according to the ANOVA, infected hosts had significantly less glycogen than uninfected hosts, but the size of this effect is weak ($d = -0.324 [-0.664; -0.006]$). Indeed, as in lipids analyses, infected and uninfected hosts has as much glycogen in acanthella trials ($d = -0.266 [-0.702; 0.177]$), and the same is true in cystacanth trials ($d = -0.362 [-0.883; 0.139]$; figure 4c). Glycogen reserves were very significantly different according to the type of trial (table 3d, figure 4c); gammarids of acanthella trials had significantly more glycogen than those of cystacanth trials, the size of this effect being very important ($d = 0.941 [0.576; 1.353]$). Indeed, acanthella-infected hosts had significantly higher glycogen reserves than cystacanth-infected hosts ($d = 1.048 [0.526; 1.681]$; figure 4c) and uninfected hosts used in acanthella trials had more glycogen than uninfected hosts of cystacanth trials ($d = 0.833 [0.309; 1.403]$; figure 4c). Both effect sizes were very significant. Therefore, contrary to other energetic reserves, the maintenance for long time in the laboratory (at least four additional weeks in our experiment) depletes glycogen reserves in gammarids, this being true for both infected and uninfected animals.

Table 3. **(a)** MANOVA analyzing the effects of infection status (infected or not), type of trial (acanthella or cystacanth) and their interaction on energetic reserves of gammarids (lipids, sugars and glycogen). ANOVAs analyzing **(b)** lipids contents, **(c)** sugars contents and **(d)** glycogen contents. Bold variables were significant.

Sources of variation	F-ratio (df num, df den)	P-value
<i>(a) General model</i>	<i>3.262</i> (9, 432)	<i>0.0007</i>
Infection status	3.341 (3, 142)	0.021
Trial	6.086 (3, 142)	0.0006
Infection status*Trial	0.718 (3, 142)	0.543
<i>(b) Lipids</i>	<i>3.639</i> (3, 144)	<i>0.014</i>
Infection status	7.713 (1, 144)	0.006
Trial	2.258 (1, 144)	0.135
Infection status*Trial	0.592 (1, 144)	0.443
<i>(c) Sugars</i>	<i>1.761</i> (3, 144)	<i>0.157</i>
Infection status	0.523 (1, 144)	0.471
Trial	3.822 (1, 144)	0.052
Infection status*Trial	0.623 (1, 144)	0.431
<i>(d) Glycogen</i>	<i>7.635</i> (3, 144)	<i><0.0001</i>
Infection status	5.010 (1, 144)	0.027
Trial	16.945 (1, 144)	<0.0001
Infection status*Trial	0.012 (1, 144)	0.914

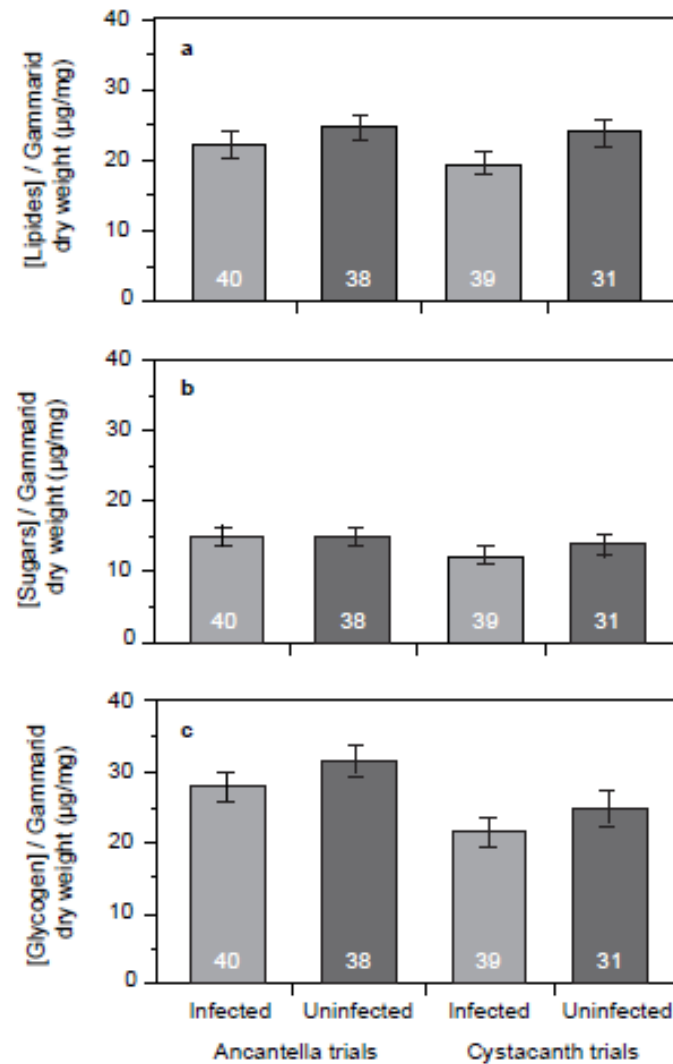


Figure 4. Effect of infection status (infected or uninfected) and type of trial (acanthella or cystacanth) on the amount of energetic reserves: (a) lipids, (b) sugars and (c) glycogen. Numbers in the bars are sample sizes.

Discussion

P. laevis acanthella stages are growing parasites reaching ten to twenty times their original weight in less than two months, a spectacular growth which should not be without costs for its amphipod host (Duclos et al. 2006). It has recently been showed that this parasite stage increases anti-predator behaviour of its host such as hiding under a refuge, allowing a reduction in predation risk of the host, thus a reduction in parasite mortality risk until reaching the infective stage (Dianne et al. 2011). This “host protection” might be costly to the host by disrupting its own optimal balance between foraging and preventing predation risk. Costs due

to the acanthella infection, if any, could therefore be either specific to the host protection, or more generally due to the parasite growth itself (Duclos et al. 2006).

In this study, we showed that acanthella-infected gammarids were slightly less active than uninfected ones and displayed increased anti-predator defences, by using more a refuge than uninfected hosts, a result similar as the one found by Dianne et al. (2011). Interestingly, here, the general difference in refuge use observed between acanthella-infected and uninfected gammarids was mostly due to a decrease in anti-predator defences in uninfected gammarids when food was outside the refuge. Uninfected hosts were therefore able to adjust their behaviour, particularly the balance between foraging and defence against predators, according to the external context. Conversely, acanthella-infected gammarids did not show such context-dependant behaviour, their level of refuge use remaining constant – and strong – whatever food position in their environment. This suggest that, in Dianne et al. (2011) where no food was provided in the experiment, the less intense refuge use displayed by uninfected gammarids was due to a foraging activity. Even if the present results apparently confirmed those obtained by Dianne et al. (2011), they are hardly directly comparable, particularly because experiments were realized with groups of individuals in their study (instead of single individuals here); it is, indeed, known that uninfected *G. pulex* individuals aggregate with conspecifics in the presence of fish cues in the environment (Kullmann et al. 2008, Durieux et al. 2012). One could have therefore attributed the more intense refuge use observed by Dianne et al. (2011) only to this grouping effect. Nevertheless, the present experiment showed that the individual behaviour of acanthella-infected gammarids is a component of the increase in refuge use.

What are the consequences of this behavioural modification on food intake? If a reduced food intake was only the consequence of refuge use, food intake of acanthella-infected hosts should have been equal to that of uninfected hosts when leaves were inside the refuge. However, this hypothesis was not confirmed by our study. Uninfected gammarids ingested more food than acanthella-infected ones, but this effect was due to two parameters. First, uninfected hosts ate more leaves inside the refuge than infected ones. Second, they ate more than acanthella-infected hosts when predator cues were detected in the environment. Apparently, intensity of refuge use did not directly impact hosts foraging and food intake, or at least was not the only factor involved. It should be noted that refuge use scores were measured at the beginning of the experiment, when intensity of predator cues was at its maximum. However, these cues might have decreased over time. Since the experiment on

food intake lasted 24 hours, foraging and food ingestion could therefore have occurred just before the end of the experiment.

Still, interesting results concerning gammarids pattern of food intake came out from this study, which could not be explained by patterns of refuge use, regardless the moment when scores of refuge use were attributed. Particularly, the fact that uninfected gammarids ate more food inside the refuge than acanthella-infected ones is surprising, since this differential behaviour did not *a priori* rely on potentials of general activity or anti-predator defences of each infection category. Besides, as previously said, uninfected gammarids ate more than acanthella-infected ones when predator cues were detected in the environment. This result suggests that uninfected hosts were able to adjust their food consumption according to the external context, in accordance with the “predation risk allocation hypothesis” of Lima & Bednekoff (1999). This hypothesis, verified in several animals (see Ferrari et al. 2009 for a review), postulates that individuals are able to increase plastically food intake under predation risk, each food foraging being more efficient when the risk is temporarily weaker (here, a decrease in time of the predation cues would mimic such a decreased risk). According to our results, acanthella-infected hosts were not able to realize such a context-dependant adjustment of food intake. Since a reduced food intake has not been revealed in cystacanth-infected hosts, it could be tempting to conclude that the observed differences between food consumption of acanthella-infected and uninfected hosts pointed out a cost specific to infection by acanthella stages. However, a few studies already showed that *G. pulex* infected with *P. laevis* cystacanths did eat less than uninfected hosts (McCahon et al. 1988, Brown & Pascoe 1989). More generally, the effect of infections on host food consumption is widespread among parasites, in both helminths and protists (see Moore 2002 for a review). Therefore, our results on cystacanths remained to be confirmed regarding the low sample size. In addition, the assumption that there is a cost specific to acanthella stage would be true if reduced food intake were directly linked to low energetic reserves.

Our results on gammarids energetic reserves showed that acanthella-infected gammarids did not suffer from depletion in energetic contents compared to uninfected hosts, whatever the type of reserves (lipids, free sugars – as glucose – and glycogen). Since acanthella-infected gammarids ate less than uninfected ones and were harbouring a growing parasite that required an important amount of reserves (see Starling 1985), the hypothesis of decreased levels of reserves in acanthella-infected hosts would have been predominant. Although surprising, our result could be explained by the fact that these infected hosts used more refuges and were less active than uninfected ones. Acanthella-infected hosts were

therefore less prone to exploration of a complex environment than their uninfected conspecifics. Indeed, glucose contents of uninfected gammarids could be the result of a balance between great food consumption when there was food nearby (increasing the amount of sugars) and exploration of their environment (decreasing sugars contents). The ability to adjust their food intake regarding the external context allowed them to keep good levels of glycogen and lipids, reserves that could later be used when the context would be unfavourable. At the opposite, acanthella-infected gammarids ate little food, which provided them a basal amount of free sugars. Regarding their high level of refuge use, all sugars gained by little food consumption could be stored as glycogen, counterbalancing the use of host glycogen by the growing acanthella (Starling 1985). As a result, levels of sugars, glycogen and lipids remained stable over time and identical to those of uninfected gammarids. Regarding our results on resources storage by gammarids, acanthella-infected ones should not suffer from a lowered food intake, given the low energy requirements by these hosts. The little energy gained by this reduced consumption seemed to be enough to compensate the probable high requirements of the acanthella. It should be noted here that caution is required when linking results of food intake to those on energy reserves of gammarids, since levels of energetic contents observed in our study were the result of more than three months of gammarids housing in the laboratory. The hypothesis described above therefore assumes that the food intake observed in our 24 hours experiment was the same during the three months of acanthella development.

Contrary to acanthella-infected hosts, results of energy storage in cystacanth-infected hosts revealed that they suffered depletion of energetic reserves. First, the amount of glycogen was significantly reduced in cystacanth-infected hosts, but also in uninfected *G. pulex* used as controls for cystacanth trials, compared to uninfected hosts of acanthella trials. This difference is probably due to a difference in the time spent at the laboratory that was one month longer for hosts used in cystacanth trials than for those used in acanthella trials. Indeed, it seemed that the more gammarids stayed at the laboratory, the less they ate (personal observation). As a consequence, free sugars necessary for exploration (which is even more important in cystacanth-infected than in uninfected hosts, the former using less refuges than the latter) should be first taken from glycogen reserves (by glycogenolysis), and then by gluconeogenesis of lipids (such as glycerol), which occurs during starvation events (see for instance Thompson et al. 2003). Thanks to this reallocation of resources, sugars could thus be maintained at a normal level in both cystacanth-infected hosts and their uninfected controls, at the expense of glycogen and lipids reserves which were considerably reduced. Moreover,

lipids are strongly used by cystacanths, particularly carotenoid pigments (carotene and astaxanthin) that accumulated in *P. laevis* cystacanths and more generally in acanthocephalan cystacanths (Gaillard et al. 2004). These specific lipids could be partly diverted from the gammarid host (Starling 1985).

An important reallocation of host resources by *P. laevis* cystacanths, due to particular maintenance conditions, could explain why our results are not in strict accordance with previous studies on acanthocephalan parasites. For instance, Plaistow et al. (2001) found that male hosts naturally infected with *P. laevis* cystacanths had more glycogen than uninfected hosts, and similar lipids contents. This increase in glycogen contents probably required time to be effective, and is more likely to be observed in old cystacanth infections of *G. pulex*. In our experiment, cystacanths were only 10 days old when hosts were dissected. Another study also found that the acanthocephalan *Polymorphus minutus* increased glycogen contents of its amphipod host in natural infections, but decreased lipids reserves (Gismondi et al. 2012). The authors hypothesized that this glycogen storage could be an alternative energetic reserve to the decrease in lipids. Finally, Cornet et al. (2010) found that sugars contents were decreased in *G. pulex* naturally infected with *P. laevis* cystacanths, and suggested that this could be linked to immunosuppression of cystacanth-infected host since total phenoloxidase activity was positively correlated to glucose contents (Cornet et al. 2009a). The levels of energetic contents that we obtained in our study are therefore contrasting with all previous analyses of acanthocephalan-infected gammarids (Plaistow et al. 2001, Cornet et al. 2010, Gismondi et al. 2012). We want to emphasize the fact that previous studies were all performed on naturally infected amphipods. In experimentally-infected hosts (our study), housing conditions might be sufficiently different from field conditions to reverse levels of energetic reserves. Moreover, several variables could not be controlled in naturally-infected hosts (such as the age of infection) that could have affected hosts physiological conditions and, thus, could potentially explain the variability of results in field experiments. More generally, in other host-parasite systems, lipids and/or glycogen reserves of infected hosts were higher (e.g. Amat et al. 1991, Ponton et al. 2005) or equal (e.g. Franz & Kurtz 2002, Rivero & Ferguson 2003) to those of uninfected ones, but almost never lower (but see Rivero et al. 2007).

Interestingly, Rivero & Ferguson (2003) found different levels of sugar contents in infected mosquitoes according to the parasitic stage of *Plasmodium*. Oocysts-infected vectors (non-infective to the host) had higher glucose contents than uninfected ones, while sporozoites-infected mosquitoes did not differ from uninfected ones in glucose contents. These stage-specific host energetic reserves could be beneficial for the parasite because a high

glucose contents in hosts harbouring the non-infective larval stage could, first, indirectly reduce the mosquito mortality risk, and second, neutralize the immune system of the vector (Rivero & Ferguson 2003). In our host-parasite system, we could wonder whether the observed decrease of food intake in acanthella-infected hosts is beneficial for the parasite and/or the host, or whether it harms one or both of the protagonists. First, a reduced food intake could indirectly enhance parasite-mediated immunosuppression of the host, *via* the modification of energy reserves, and therefore be beneficial for the parasite (Cornet et al. 2009a). The efficiency of the immunosuppression, already demonstrated in *G. pulex* infected with *P. laevis* cystacanths (Rigaud & Moret 2003, Cornet et al. 2009b), remains to be investigated at the acanthella stage. However, even if *P. laevis* acanthellae did immunosuppress their gammarid host, the link with energetic storage could not be made since acanthella-infected hosts contained as many energetic reserves as uninfected hosts. Second, decreased food intake in acanthella-infected gammarids could be the result of a reduced motivation to feed; together with a reduced general activity of acanthella-infected hosts, this could enhance their hiding behaviour since these hosts would be less prone to forage (Dianne et al. 2011, this study). This assumption is in agreement with our results showing that acanthella-infected gammarids were unable to adjust their feeding behaviour according to the predation risk. Moreover, this potential reduced motivation to feed could be explained by the good energetic reserves of acanthella-infected hosts, and explain why they did not feed even when food was nearby (i.e. under their refuge). In this “parasite-centred view”, acanthella-infected *G. pulex* seemed to act as zombies (hiding more, moving and feeding less, not responding to the external context) in a way that benefits the parasite (Rozen 2011). Besides, *P. laevis* acanthella did not seem to suffer from its host reduced feeding behaviour, energy available for its growth being normal. Interestingly, for the same reason, parasitized gammarids did not seem to suffer either from their own reduced motivation to feed. In addition, they benefited from an increased survival when infected with a *P. laevis* acanthella (Dianne et al. 2011). The net effect of acanthella infection may therefore be commensal, or even beneficial, for *G. pulex*.

So why did uninfected hosts not display such protective behaviour naturally? The answer might be in life history trade-offs of parasitized gammarids (see Agnew et al. 2000). For instance, the reproductive behaviour of acanthella-infected gammarids could be affected by the infection. When infected with a *P. laevis* acanthella, gammarid's best strategy to enhance fitness would thus be to take advantage of this increased survival and sufficient energetic storage to reproduce. It has already been showed that cystacanth-infected male

gammarids did reproduce less than uninfected ones, a strategy potentially benefiting the parasite for its own transmission (Bollache et al. 2001). However, whether male *G. pulex* infected with a *P. laevis* acanthella are able to reproduce remains to be investigated. If they do, such saving of energy (by moving less and using more refuges) to invest in reproduction could be seen as a compensatory response of infection by acanthella-infected gammarids. As a consequence, the host reduced motivation to feed could be induced by acanthellae allowing an exploitation of host compensatory responses, provided that these responses are really beneficial to the parasite stage (Lefèvre et al. 2008). Future studies assessing this question will provide exciting knowledge about host-parasite conflicts of interests, particularly in hosts infected with a manipulating parasite.

Acknowledgements

We thank Sébastien Motreuil and Aude Balourdet for their technical assistance in the field and at the laboratory. LD was funded by a joined doctoral grant from the CNRS and the Conseil Régional de Bourgogne. The study was funded by a research grant (Grant n°9201/AA/O/040/S00619) from the Conseil Régional de Bourgogne.

References

- Agnew, P., Koella, J.C. & Michalakis, Y. 2000. Host life history responses to parasitism. *Microbes Inf.* **2**: 891-896.
- Amat, F., Gozalbo, A., Navarro, J.C., Hontoria, F. & Varó, I. 1991. Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism. *Hydrobiologia* **212**: 39-44.
- Anderson, R.A., Koella, J.C. & Hurd, H. 1999. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. B* **266**: 1729-1733.
- Bakker, T.C.M., Mazzi, D. & Zala, S. 1997. Parasite-induced changes in behavior and color make *Gammarus pulex* more prone to fish predation. *Ecology* **78**: 1098-1104.

Bethel, W.M. & Holmes, J.C. 1974. Correlation of development of altered evasive behavior in *Gammarus lacustris* (Amphipoda) harboring cystacanths of *Polymorphus paradoxus* (Acanthocephala) with infectivity to the definitive host. *J. Parasitol.* **60**: 272-274.

Bollache, L., Gambade, G. & Cézilly, F. 2001. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**: 296–303.

Brown, A.F. & Pascoe, D. 1989. Parasitism and host sensitivity to cadmium – an acanthocephalan infection of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *J. Appl. Ecol.* **26**: 473-487.

Cézilly, F., Grégoire, A. & Bertin, A. 2000. Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study on the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology* **120**: 625-630.

Chubb, J.C., Ball, M.A. & Parker, G.A. 2010. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends Parasitol.* **26**: 93-102.

Cornet, S., Biard, C. & Moret, Y. 2009a. Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia* **159**: 257-269.

Cornet, S., Franceschi, N., Bauer, A., Rigaud, T. & Moret, Y. 2009b. Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **39**: 221-229.

Cornet, S., Sorci, G. & Moret, Y. 2010. Biological invasion and parasitism: invaders do not suffer from physiological alterations of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*. *Parasitology* **137**: 137-147.

Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Gaillard, M., Léger, E. & Rigaud, T. 2011. Protection first then facilitation: a manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. *Evolution* **65**: 2692-2698.

Duclos, L.M., Danner, B.J. & Nickol, B.B. 2006. Virulence of *Corynosoma constrictum* (Acanthocephala: Polymorphidae) in *Hyalella azteca* (Amphipoda) throughout parasite ontogeny. *J. Parasitol.* **92**: 749-755.

Durieux, R., Rigaud, T. & Médoc, V. 2012. Parasite-induced suppression of aggregation under predation risk in a freshwater amphipod: Sociality of infected amphipods. *Behav. Proc.* In press.

Ferrari, M.C.O., Sih, A. & Chivers, D.P. 2009. The paradox of risk allocation: a review and prospectus. *Anim. Behav.* **78**: 579-585.

Franceschi, N., Bauer, A., Bollache, L. & Rigaud, T. 2008. The effects of parasite age and intensity on variability in acanthocephalan-induced behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **38**: 1161-1170.

Franz, K. & Kurtz, J. 2002. Altered host behaviour: manipulation or energy depletion in tapeworm-infected copepods? *Parasitology* **125**: 187-196.

Gaillard, M., Juillet, C., Cézilly, F. & Perrot-Minnot, M.-J. 2004. Carotenoids of two freshwater amphipod species (*Gammarus pulex* and *G. roeseli*) and their common acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*. *Comp. Bioch. Physiol. B* **139**: 129-136.

Gismondi, E., Cossu-Leguille, C. & Beisel, J.-N. 2012. Does the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* modify the energy reserves and antitoxic defences of its intermediate host *Gammarus roeseli*? *Parasitology* **139**: 1054-1061.

Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. 2007. Differential influence of two acanthocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Anim. Behav.* **74**: 1311-1317.

- Koella, J.C., Rieu, L. & Paul, R.E.L. 2002. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behav. Ecol.* **13**: 816-820.
- Kullmann, H., Thünken, T., Baldauf, S.A., Bakker, T.C. & Frommen, J.G. 2008. Fish odour triggers conspecific attraction behaviour in an aquatic invertebrate. *Biol. Lett.* **4**: 458-460.
- Lafferty, K.D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitol. Today* **15**: 111-115.
- Laguerre, C., Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J., Motreuil, S. & Bollache, L. 2007. Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* **88**: 2839-2847.
- Lefèvre, T., Roche, B., Poulin, R., Hurd, H., Renaud, F. & Thomas, F. 2008. Exploiting host compensatory responses: the 'must' of manipulation? *Trends Parasitol.* **24**: 435-439.
- Lima, S.L. & Bednekoff, P.A. 1999. Temporal variation in danger drives antipredator behaviour: the predation risk allocation hypothesis. *Am. Nat.* **153**: 649-659.
- Mathis, A. & Hoback, W.W. 1997. The influence of chemical stimuli from predators on precopulatory pairing by the amphipod, *Gammarus pseudolimnaeus*. *Ethology* **103**: 33-40.
- McCahon, C.P., Brown, A.F. & Pascoe, D. 1988. The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* (Muller 1776) on the acute toxicity of cadmium to its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex* (L). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**: 239-243.
- McCarthy, H.O., Fitzpatrick, S. & Irwin, S.W.B. 2000. A transmissible trematode affects the direction and rhythm of movements in a marine gastropod. *Anim. Behav.* **59**: 1161-1166.
- Moore, J. 2002. *Parasites and the behavior of animals*. Oxford University Press, New-York.
- Nakagawa, S. & Cuthill, I.C. 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol. Rev.* **82**: 591-605.

Parker, G.A., Ball, M.A., Chubb, J.C., Hammerschmidt, K. & Milinski, M. 2009. When should a trophically transmitted parasite manipulate its host? *Evolution* **63**: 448-458.

Plaistow, S.J., Troussard, J.-P. & Cézilly, F. 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 346-351.

Ponton, F., Biron, D.G., Joly, C., Duneau, D. & Thomas, F. 2005. Ecology of populations parasitically modified: a case study from a gammarid (*Gammarus insensibilis*) - trematode (*Microphallus papillorobustus*) system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **299**: 205-215.

Poulin, R. 1995. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *Int. J. Parasitol.* **25**: 1371-1383.

Poulin, R., Curtis, M.A. & Rau, M.E. 1992. Effects of *Eubothrium salvelini* (Cestoda) on the behaviour of *Cyclops vernalis* (Copepoda) and its susceptibility to fish predators. *Parasitology* **105**: 265-271.

Rigaud, T. & Moret, Y. 2003. Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression? *Parasitology* **127**: 571-577.

Rivero, A., Agnew, P., Bedhomme, S., Sidobre, C. & Michalakis, Y. 2007. Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. *Parasitology* **134**: 1355-1362.

Rivero, A. & Ferguson, H.M. 2003. The energetic budget of *Anopheles stephensi* infected with *Plasmodium chabaudi*: is energy depletion a mechanism for virulence? *Proc. R. Soc. B* **270**: 1265-1271.

Rozen, D.E. 2011. Parasites and zombie gammarids. *J. Exp. Biol.* **214**: IV.

Schmidt, G.D. 1985. Development and life cycles. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 273-305. Cambridge University Press, New-York.

Schwartz, A. & Koella, J.C. 2001. Trade-offs, conflicts of interests and manipulation in *Plasmodium*-mosquito interactions. *Trends Parasitol.* **17**: 189-194.

Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E.T. 2005. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Anim. Behav.* **70**: 889-894.

Starling, J.A. 1985. Feeding, nutrition and metabolism. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 125-212. Cambridge University Press, New-York.

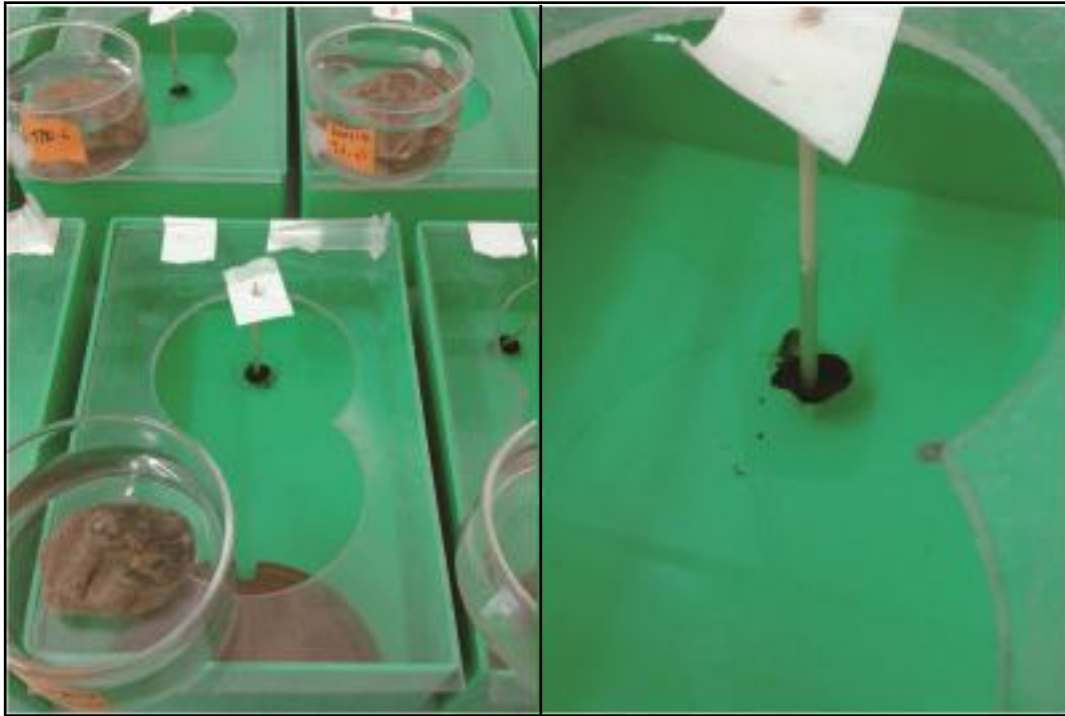
Taraschewski, H. 2000. Host-parasite interactions in acanthocephala: a morphological approach. *Adv. Parasitol.* **46**: 1-179.

Thompson, S.N., Borchardt, D.B. & Wang, L.-W. 2003. Dietary nutrient levels regulate protein and carbohydrate intake, gluconeogenic/glycolytic flux and blood trehalose level in the insect *Manduca sexta* L. *J. Comp. Physiol. B* **173**: 149-163.

Van Handel, E. 1985a. Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1**: 299-302.

Van Handel, E. 1985b. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1**: 302-304.

Appendix 1. Device used for behavioural measurements. Rectangular aquaria were composed of a refuge (a half of a terracotta saucer with an aperture) at one end, and a wooden pick at the other end. The wooden pick were used to fix food (two discs of elm leaves) in one half of trials (food was placed under the refuge in the other half of trials).



Chapitre 2

B. Effet de l'infection par une acanthelle sur la probabilité de mise en couple des mâles amphipodes.

Ce second sous-chapitre est la suite directe du précédent. L'objectif ici était d'étudier le comportement de mise en couple des mâles *G. pulex*, infectés par une acanthelle de *P. laevis*, avec une femelle réceptive à la copulation. Nous savons d'ores-et-déjà que les gammares mâles naturellement infectés par un cystacanthé de *P. laevis* montrent un effort reproductif réduit par rapport aux gammares sains (Bollache et al. 2001). Chez les gammares, la sexe-ratio opérationnelle est fortement biaisée en faveur des mâles, notamment à cause de la courte période pendant laquelle une femelle est réceptive à la copulation (juste après sa mue) et de l'asynchronie des périodes de reproduction des femelles. Sous ces contraintes, un comportement de gardiennage précopulatoire (ou amplexus) a évolué chez les gammares mâles. Pendant l'amplexus, le mâle s'accroche à la femelle grâce à ses gnathopodes jusqu'à ce qu'elle mue, permettant ainsi la fertilisation et la ponte des œufs ; la femelle est par la suite relâchée par le mâle. Grâce à une infestation expérimentale, nous avons obtenu des gammares mâles infectés par les deux stades du parasite : non-infectieux (acanthelle) dans un premier temps, puis infectieux (cystacanthé) dans un second temps. Pour ces deux stades de développement du parasite, nous avons comparé la probabilité de mise en couple des gammares infectés par rapport aux gammares non-infectés maintenus dans les mêmes conditions. Une femelle réceptive à la copulation (échantillonnée en amplexus et séparée de son mâle) a été introduite dans un cristalliseur contenant soit un mâle infecté, soit un mâle non-infecté ; le comportement des gammares a été enregistré pendant 24 heures.

D'après nos résultats, les gammares infectés par une acanthelle de *P. laevis* présentent la même probabilité de mise en couple que les gammares non-infectés. Le temps de mise en couple est également identique entre les deux types d'hôtes. A l'inverse, les gammares infectés par un cystacanthé entrent significativement moins en amplexus que les gammares non-infectés et ceux infectés par une acanthelle, confirmant ainsi les résultats d'une précédente étude effectuée sur des gammares naturellement infectés. Ces résultats nous indiquent que le stade acanthelle de *P. laevis* n'induit pas de coûts pour son hôte en termes de probabilité de mise en couple. Ils indiquent également qu'aucune stratégie de compensation de la réduction de l'effort reproductif des gammares infectés par un cystacanthé n'a été

sélectionnée chez les gammares infectés par une acanthelle. Toutefois, nos résultats ne portent que sur les gammares infectés par une acanthelle « tardive », c'est-à-dire étant proche du passage au stade infectieux. Davantage d'études seront nécessaires plus en amont dans le développement de l'acanthelle dans le gammare. En effet, il est tout à fait envisageable qu'une augmentation de l'effort reproductif des gammares mâles soit effective dans les premiers moments succédant l'infection, ou répartie sur toute la durée de vie de l'acanthelle dans son hôte.

Toujours est-il que nous avons observé un comportement reproducteur du gammare mâle différentiel selon le stade de développement du parasite. Ceci pose de nombreuses questions concernant les mécanismes mis en place chez l'hôte infecté par un cystacanthé ; la réduction de la mise en couple de ces gammares pourrait alors être due à un sous-produit de la manipulation comportementale du gammare induite par le cystacanthé de *P. laevis*. Quant aux gammares infectés par une acanthelle, il se pourrait que le maintien de leur reproduction soit le résultat d'un détournement des ressources de l'hôte de la croissance vers la reproduction. Nous serions alors en présence d'une réponse compensatoire de l'hôte due à l'infection par une acanthelle de *P. laevis*, permettant à l'hôte parasité d'avoir une aptitude phénotypique certes moindre que celle des hôtes non-infectés, mais meilleure que si aucune réponse compensatoire n'avait été sélectionnée. Cette étude amène de nombreuses perspectives quant à l'étude des interactions entre parasite manipulateur et hôte intermédiaire, notamment lorsque le parasite n'est pas encore infectieux pour son hôte définitif.

Article 3

Dianne, L., Bauer, A., Rigaud, T. & Perrot-Minnot, M.-J. Differential pairing success in amphipods infected with an acanthocephalan according to the developmental stage of the parasite.

Differential pairing success in amphipods infected with an acanthocephalan according to the developmental stage of the parasite

L. DIANNE, A. BAUER, T. RIGAUD & M.-J. PERROT-MINNOT

UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

Abstract

In response to fitness costs of infection, many hosts have evolved adaptive adjustments of their life-history strategy. For instance, reduced reproductive effort in infected hosts may be a strategy of resource re-allocation to alleviate the negative effect of infection on survival. By doing so, these hosts divert resources, firstly devoted to their reproduction, to their survival. Alternatively, an infected host could increase its reproductive effort to anticipate and compensate for future negative effects of infection on reproduction and/or survival. In this study, we investigated the effect of infection the acanthocephalan manipulative parasite *Pomphorhynchus laevis* on the male reproductive behaviour of its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex*. Experimentally infected males did not differ from uninfected ones in their propensity to pair with a receptive female, when parasite larva was still at an intermediate developmental stage (acanthella). By contrast, pairing success of infected males was significantly decreased after the parasite had reached the last developmental stage, infective for its definitive host (cystacanth). Our results suggest that gammarids infected with an acanthella have not evolved a strategy of reproductive compensation to balance the partial castration induced later by the infective stage of *P. laevis*. We discussed this result in terms of benefits gained by the host and/or the parasite to maintain host reproduction at the acanthella stages, and addressed the need for more studies on reproductive effort of infected hosts.

Key Words: reproductive behaviour, manipulative parasites, non-infective parasitic stage, fecundity compensation, reduced reproductive effort, *Gammarus pulex*, *Pomphorhynchus laevis*.

Introduction

Detrimental effect of parasites on host survival, as well as many other host traits linked to its fitness, is a well-known phenomenon. It has often led to adaptive adjustments of the host life-history strategy (see reviews in Minchella 1985, Forbes 1993, Agnew et al. 2000, Hurd 2001). For instance, in response to parasitism, host reproductive effort could be either decreased or increased, and both could potentially benefit the host. However, in most cases, it is still unclear to what extent these modifications of host reproduction are adaptive to the host or the parasite, or even whether they are a by-product of the infection (Hurd 2001). Forbes (1993), in an attempt to shed light on host adaptive life history responses to parasitism, classified parasites according to their development within (or outside) their hosts, and inferred the different strategies of compensation that should have been selected. Type I parasites develop rapidly in their host and greatly affect their current reproduction. Hosts are therefore expected to compensate for parasite negative effects by reducing their current reproduction to increase survival, and thus potentially increase their future reproduction (see a review in Hurd 2001). At the opposite, type II parasites display a slower growth rate in their host and have a moderate immediate virulence. Hosts infected with type II parasites are therefore expected to increase their reproductive effort early in the infection (e.g. by reproducing more often at the beginning of infection or by shortening their time to sexual maturity, see respectively Minchella & LoVerde 1981 and Thornill et al. 1986 for examples in the snail *Biomphalaria glabrata* infected with the trematode *Schistosoma mansoni*).

Parasites with complex life cycles fit into the second category of parasites described by Forbes (1993). These parasites need at least two hosts to complete their life cycle: an intermediate host, in which they grow until a larval stage infective for the next host, and a definitive host in which they mature and reproduce. Growth in intermediate hosts is generally long compared to the life span of their hosts, leading to parasite adaptations to optimally exploit their hosts (Chubb et al. 2010) as well as host adaptations to counter the negative effects of infection (see examples in Agnew et al. 2000 and Hurd 2001). Among these complex life-cycle parasites, many helminths are trophically transmitted, meaning that they are transmitted through the ingestion of the infected intermediate host by the definitive host. As a consequence, strategies of intermediate host exploitation favouring parasite transmission have been selected (Lafferty 1999). For instance, many trophically-transmitted parasites are able to manipulate the behaviour of their intermediate host in ways increasing host

vulnerability to predation by a suitable definitive host, thus enhancing their own transmission probability (see Moore 2002 for a review).

Several studies emphasized the effect of manipulative parasites on their intermediate host reproduction. For example, the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* reduces the reproductive effort of male and female intermediate hosts, the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (Bollache et al. 2001, 2002, respectively). Other acanthocephalans are known to reduce the reproductive effort of their male intermediate host (e.g. Zohar & Holmes 1998, Sparkes et al. 2006, Bierbower & Sparkes 2007, Rauque & Semenas 2009), as well as cestodes (e.g. Galipaud et al. 2011b). Reduction of reproductive effort in infected host is generally interpreted as a by-product of infection. For instance, it has been suggested that infected male hosts could have been physiologically castrated, given that host castration could greatly alter host behaviour (Baudoin 1975). However, a reduced spermatogenesis has never been found in acanthocephalan-infected male hosts showing a decrease in reproductive effort (Zohar & Holmes 1998, Bierbower & Sparkes 2007). Another hypothesis suggests that the reduction in reproductive effort in male intermediate host could be a side-effect of host behavioural manipulation by parasites, possibly through the alteration of a particular neuromodulatory system. It is indeed known that manipulative parasites, especially acanthocephalans, alter their intermediate host behaviour through the modification of some neuromodulatory system (Helluy & Holmes 1990, Tain et al. 2006). This altered brain physiology in infected males could potentially decrease host ability to respond to female receptivity for reproduction, preventing them from initiating pairing (see Bollache et al. 2001 and references therein). Conversely, it has rarely been suggested that host reduction in reproductive effort could be part of a manipulative parasite strategy to enhance its own transmission to the next host. In this case, decreasing host reproductive effort could increase the probability of encountering the next host if, for instance, decreasing motivation to mate is associated with decreased shelter use (as discussed in the studies of Sparkes et al. 2006 and Bierbower & Sparkes 2007). Obviously, it seems hardly conceivable that such a reduction of host reproductive effort could be a host strategy, since infected manipulated hosts have a reduced lifespan.

Interestingly, the cases of parasite-induced reduction in reproductive effort cited above only concern manipulative parasites at a developmental stage infective to the next host in the life cycle. However, parasite larvae grow into several developmental stages before reaching infectivity, and the time an infective larva awaits for transmission is probably shorter than the developmental time necessary to reach this infective stage. Since these larval stages are not

sufficiently developed morphologically and physiologically to establish in the next host (i.e. they are still non-infective to the next host), predation of the infected intermediate host leads to parasite death at this developmental stage (e.g. Schmidt 1985). Parker et al. (2009) have modelled that a manipulative parasite whose non-infective larval stage is able to increase its own survival until the infective stage (by enhancing intermediate host survival), before manipulating its host behaviour when infective (in ways increasing its probability to be transmitted), should be selected relatively to a manipulative parasite that induces no change in its host before reaching infectivity. Dianne et al. (2011) verified this prediction experimentally, showing that males of the amphipod *G. pulex* displayed an increased refuge use when infected with the non-infective stage of *P. laevis* (acanthella). This apparent host protection diminished host predation risk compared to uninfected individuals. When the parasite became infective for the fish, male *G. pulex* showed a behavioural switch, from protection to exposure, thus increasing the probability of *P. laevis* transmission to the fish (Dianne et al. 2011). A recent study on the same host-parasite system showed that, although they had a reduced motivation to feed, acanthella-infected male hosts did not suffer depleted energetic reserves (Dianne et al. *in prep*). Therefore, the host (and, consequently, probably the parasite) did not seem to suffer physiological costs in terms of energetic reserves. Dianne et al. (*in prep*) suggested that host behavioural changes observed in acanthella-infected host (i.e. increased refuge use and decreased general activity compared to uninfected hosts) might be the result of a host strategy to save energetic resources for investment in reproduction.

In this study, we investigated the effect of infection by an acanthella of *P. laevis* on the reproductive ability of its male intermediate host *G. pulex*. Reproductive behaviour of *G. pulex* is representative of mating strategies of many crustaceans. It is characterized by a phase of precopulatory mate guarding, a common male competitive strategy due to the short period of time during which females are receptive for copulation (Parker 1974). During the phase of precopulatory mate guarding (or amplexus), the male amphipod guard a potential mate by carrying a female beneath its ventral surface for several days (e.g. Galipaud et al. 2011a). After female moult (the only moment where copulation and egg fertilization is possible), mating occurs, thus meaning the end of the amplexus (Sutcliffe 1992). It is known that the precopulatory mate guarding phase is costly to either both the male and the female (but see Galipaud et al. 2011a). Plaistow et al. (2003) showed, for instance, that the amplexus is energetically costly to *G. pulex* males. It has also been showed that gammarids energetic reserves are greatly affected by parasites, such as the cystacanth stage of the acanthocephalan *P. laevis* (Plaistow et al. 2001, Dianne et al. *in prep*). *P. laevis* is a trophically-transmitted

parasite that manipulates the behaviour of its amphipod intermediate host *G. pulex* when infective for the fish definitive host (i.e. cystacanth stage), in a way enhancing its probability of transmission between the two hosts (Cézilly et al. 2000, Kaldonski et al. 2007, Lagrue et al. 2007, Franceschi et al. 2008, Dianne et al. 2011). When investigated at a younger non-infective stage of *P. laevis*, some of these behaviours were not altered in *G. pulex* infected with the acanthella (Franceschi et al. 2008, Dianne et al. 2011). Actually, acanthella-infected amphipods increase their level of refuge use, which decrease their risk of being predated by a fish (Dianne et al. 2011). *G. pulex* males infected with a cystacanth display a reduced probability to pair with a receptive female than uninfected ones (Bollache et al. 2001), while nothing is known about the reproductive behaviour of acanthella-infected male hosts. Three hypotheses could be proposed for the reproductive behaviour of acanthella-infected male gammarids. First, acanthella-infected gammarids may be “behaviourally castrated”, as cystacanth-infected males, and thus have a lower pairing success compared to uninfected males. This could be a side-effect of infection on male reproductive effort, independent of parasitic stages. Second, it is conceivable that acanthella-infected gammarids have the same pairing success as uninfected gammarids, as it has already been showed in acanthocephalan-infected isopods (Sparkes et al. 2006) and amphipods (Rauque & Semenas 2009). Third, acanthella-infected *G. pulex* could invest more in reproduction than uninfected gammarids, a plastic response to compensate for future costs of infection by a manipulative larva. This would result in a higher proportion of acanthella-infected gammarids that initiate precopulatory mate guarding than that of uninfected gammarids. It remains unclear whether infected gammarids could reproduce more than uninfected gammarids, since healthy hosts are supposed to display an optimal reproductive behaviour. However, Lemaître et al. (2009) suggested that, in a healthy *G. pulex* population, always the same fraction of the male population does not have access to reproduction. We therefore hypothesized that infection of males by a *P. laevis* acanthella could modify this pattern, increasing the proportion of males having access to receptive females.

Materials and Methods

Biological material and experimental infections

Uninfected male *G. pulex* were collected in June 2012 in a small tributary of the Suzon River, Burgundy, eastern France (47°23'56.19"N; 4°50'31.13"E). Since *P. laevis* was never encountered in this host population, we considered it as naïve for this parasite. Hosts were acclimated at the laboratory for a week before experimental infections under a 12:12 light:dark cycle, and fed during all the experiment with conditioned elm leaves (*Ulmus laevis*) supplemented with standard fish food.

Naturally infected chubs (*Leuciscus cephalus*) were caught in June 2012 in the Vouge river (47°09'34.36"N; 5°09'02.50"E). Adult *P. laevis* parasites were removed from fish intestines and parasite eggs were collected by dissecting female *P. laevis*. Molecular identification of parasites, based on size polymorphism of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) rDNA gene, was performed following Franceschi et al. (2008) to distinguish *P. laevis* parasites from a sympatric species of *Pomphorhynchus* parasites in this population of chubs. Fourteen clutches (one clutch corresponding to one female parasite) from 7 different fish were kept for the experimental infection.

The experimental infection was carried out following the procedure of Franceschi et al. (2008). Briefly, a parasite egg suspension of determined concentration (100 eggs per gammarid) was deposited on a 1 cm² piece of elm leaf, on which male gammarids were allowed to feed for 48 hours. A total of 455 male *G. pulex* were exposed to parasite eggs. We maintained 210 control gammarids, unexposed to parasite eggs, in the same conditions as the exposed ones. From the sixth week post-exposure, the presence of *P. laevis* acanthellae was checked once a week inspecting gammarids through a dissecting microscope. Acanthellae can be detected through host cuticle (translucent light-orange and shapeless larval stage). Acanthellae were observed at 9 ± 1 weeks post-exposure in this experiment, and the first trials of before behavioural experiments 48 hours later ("acanthella trials"). About 10 days after the emergence of acanthellae, cystacanths were visible in the remaining gammarids. To control for the effectiveness of cystacanth-induced "behavioural castration" of gammarids (Bollache et al. 2001), we performed "cystacanth trials" 10 days after parasites reached the cystacanth stage (12 ± 1 weeks post-exposure). This delay ensured the establishment of parasite-induced behavioural manipulation of hosts (Franceschi et al. 2008).

Behavioural measurements

Inclination to pair of infected and control gammarids was recorded with an infra-red camera, using ViewPoint device (Viewpoint Life Sciences, Inc. - 2010). During "acanthella trials", we

tested acanthella-infected *versus* uninfected gammarids; three weeks later, for “cystacanth trials”, we recorded the behaviour of cystacanth-infected *versus* uninfected gammarids. In each type of trial, one male gammarid (infected or uninfected) was placed individually in a small glass dish (Ø 6 cm), filled with conditioned water (dechlorinated, oxygenated and UV-treated tap water at $15\pm 1^\circ\text{C}$). A receptive female, recently separated from a male (i.e. caught in amplexus), was then introduced in each dish. Recording started immediately and lasted 24 hours. Videos were examined after the experiment by a unique investigator. The inclination of male gammarids to form a pair with the receptive female was measured as the proportion of gammarids that did pair and the mean time to pair.

Statistical analyses

The effect of infection status (infected or not) of male gammarids on the probability to form a pair with a female was analysed with Fisher exact tests for each type of trial (acanthella and cystacanth). We then analyse the time to pair of male gammarids with a Cox proportional-hazard regression (one for each type of trial), with the infection status as an explanatory variable. The same analyses were performed to compare patterns of pairing success of acanthella-infected and cystacanth-infected hosts.

All analyses were performed with JMP 7.0.1 (SAS Institute).

Results

In acanthella trials, the probability to form a pair during the 24 hours of experiment was similar in acanthella-infected and uninfected gammarids (Fisher exact test: $P = 0.999$, figure 1a). There was no significant difference between the time to pair of acanthella-infected gammarids and that of uninfected ones (Cox proportional-hazard regression: $\chi^2 = 0.005$, $P = 0.946$; figure 1a). Everything else being equal, and at a given time, being infected with a *P. laevis* acanthella only decreased the probability of infected males to pair with a female by 1% compared to uninfected males (Exponentiated regression coefficient: 1.010). Conversely, in cystacanth trials, cystacanth-infected hosts paired significantly less with a receptive female than uninfected ones (Fisher exact test: $P = 0.0008$, figure 1b). Moreover, cystacanth-infected gammarids were longer to pair with a female than uninfected ones (Cox proportional-hazard regression: $\chi^2 = 9.469$, $P = 0.002$; figure 1b). Everything else being equal, at a given time,

being infected with a *P. laevis* cystacanth decreased the probability of infected males to pair with a female by 81% compared to uninfected males (Exponentiated regression coefficient: 1.817).

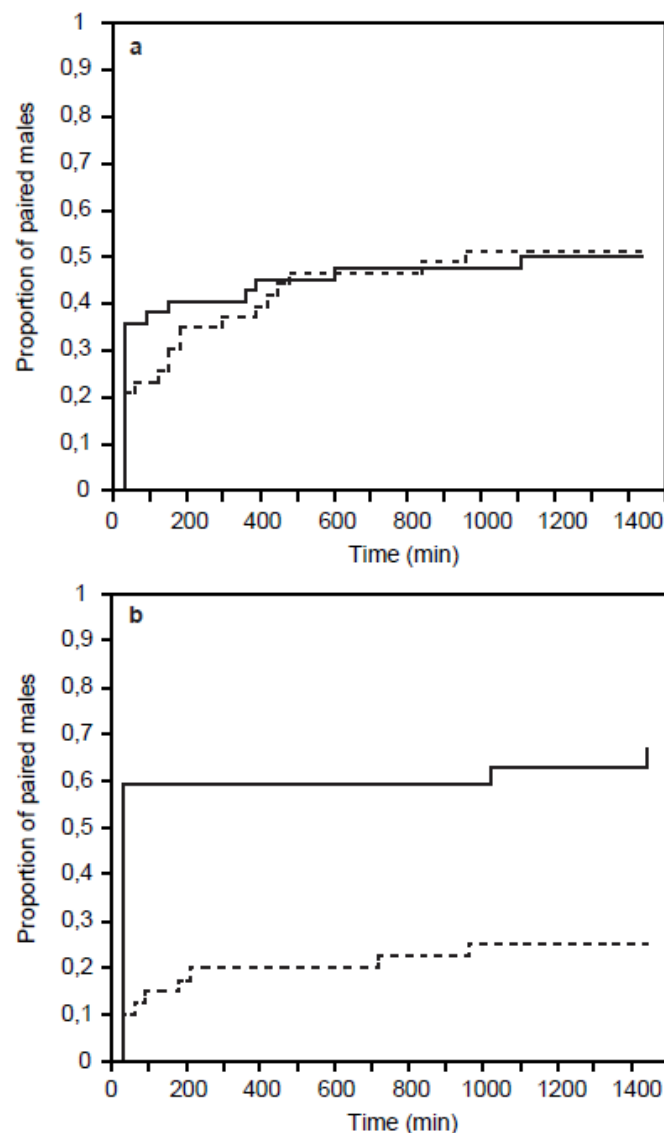


Figure 1. Proportion of male gammarids that did pair with a receptive female according to time in (a) acanthella trials and (b) cystacanth trials. Full lines represent uninfected hosts (N = 42 in acanthella trials, N = 27 in cystacanth trials) and dotted lines infected ones (N = 43 in acanthella trials and N = 40 in cystacanth trials).

It is worth noting that cystacanth-infected hosts were significantly less likely to form a pair with a female than acanthella-infected ones (Fisher exact test: $P = 0.013$). Cystacanth-infected males were also longer to pair with a female than acanthella-infected hosts (Cox proportional-hazard regression: $\chi^2 = 5.531$, $P = 0.019$). Everything else being equal, at a given time, male gammarids infected with a *P. laevis* cystacanth had a probability to pair with a

female decreased by 54% compared to uninfected males (Exponentiated regression coefficient: 1.540).

Discussion

Decreased reproductive effort in infected hosts is a phenomenon that has been interpreted either as an adaptive strategy of the parasite to acquire more resources for its own growth, or as a host response to energetically costly infection, shifting the optimal investment in reproduction and maintenance (Hurd et al. 2001).

In our study, we showed that acanthella-infected male of *G. pulex* were as likely to pair with a receptive female as uninfected males, in the absence of a competitor. Both the proportion of gammarids that did pair and the time to form a pair were comparable in acanthella-infected and uninfected males. This result is in agreement with the few previous studies that investigated the reproductive effort of male intermediate hosts harbouring the non-infective stage of a parasite. For instance, Sparkes et al. (2006) showed that male isopods (*Caecidotea intermedius*) harbouring the acanthella stage of the acanthocephalan parasite *Acanthocephalus dirus* were as likely as uninfected isopods to be found in pair with a female, in the field. Moreover, acanthella-infected males were as likely to form a pair with a female as uninfected ones when both males were competing for a receptive female. Similarly, Rauque & Semenas (2009) found that both male and female amphipods of the species *Hyaella patagonica* infected with an acanthellae of *Acanthocephalus tumescens* were as likely to be found in pair in the field as uninfected amphipods. In addition, using the same experimental infection, we also showed that when harbouring a cystacanth parasite (three weeks later), infected *G. pulex* were less likely to initiate a precopulatory mate guarding with a receptive female than uninfected gammarids. Decreased pairing success of cystacanth-infected male *G. pulex* has also been reported in naturally-infected gammarids (Bollache et al. 2001). Males of *G. pulex* infected by *P. laevis* therefore displayed a differential reproductive behaviour according to the larval developmental stage harboured.

From the host's point of view, our result suggests that no reproductive compensation has been selected in *G. pulex* in response to infection by developing larvae. Since acanthocephalans are parasites that develop slowly in their intermediate host (when non-infective for the definitive host) before being virulent in terms of host behavioural manipulation and pairing success drop-off (when infective) (Dianne et al. 2011, this study),

they fit the category of type II parasites proposed by Forbes (1993). These parasites particularly affect future, but not current, host reproduction. As a consequence, a strategy of fecundity compensation, i.e. an increase in reproductive effort at the beginning of infection, is expected to be selected to counter the latter detrimental effects of parasitism (see reviews in Minchella 1985, Forbes 1993, Agnew et al. 2000, Hurd 2001). Several studies reported on increased fecundity of female hosts (see for instance Minchella & LoVerde 1981 and Thornhill et al. 1986 for studies on female function of hermaphroditic snails infected with the trematode *Schistosoma mansoni*), but relatively few studies focused on compensation of parasitism by an increase in reproductive effort in male hosts. Among these, McCurdy et al. (2000) showed that males of the amphipod *Corophium volutator*, the second intermediate host of the trematode parasite *Gynaecotyla adunca*, exhibited a differential reproductive effort according to the stage of the parasite. When recently infected (i.e. by non-infective stages of the parasite), male amphipods were more likely to mate with a receptive female and fertilized more eggs than uninfected ones. It has to be noted that this difference was only significant when males mated with their first female, i.e. at the very beginning of parasite development. The absence of increased reproductive effort later in the experiment could either be due to the inability of infected males to increase their investment in reproduction with more than one female, or due to an effect of parasite development (increased reproductive effort could only been seen at the first moments following the infection). Conversely, males infected with encysted metacercariae (the infective stage of the trematode) were less likely to mate with a female than uninfected ones; at this parasite stage, this effect was only significant after multiple mating (infected males mated as much as uninfected males only with the first female after reaching the infective stage) (McCurdy et al. 2000). This study was one of the first to find compensation of parasitism by increasing reproductive effort at the beginning of the infection in infected males.

In this study, we did not show any increase in reproductive effort of acanthella-infected male amphipods. However, we did not record the reproductive behaviour of infected gammarids just after the exposure to parasite eggs. As showed by McCurdy et al. (2000), fecundity compensation may occur only in the early step of infection, and then may decrease as the parasite develops inside the intermediate host. The absence of increased reproductive effort later in the course of parasite development could be due to the inability of infected males to sustain an increased reproductive investment. Since young – sexually immature – gammarids, which are also the smallest ones, are much less likely to be parasitized by *P. laevis* in the field (Lagrange et al. 2007), we can hardly suggest that gammarids could bring

forward their age at sexual maturity to counter the effect of parasitism, as it has been shown in snails infected with a trematode (Thornhill et al. 1986). Thus, an increase in reproductive effort could have been selected in male *G. pulex* infected with *P. laevis* acanthellae through physiological rather than behavioural adjustments. Physiological measurements in infected male gammarids such as quantitative and qualitative measurements of sperm (or even gonad size) should be done in future studies to test this hypothesis. So far, the quantity and quality of sperm has not been found to be affected in males infected with an acanthocephalan parasite, but these measures were performed at the cystacanth stage when pairing success is also decreased (Zohar & Holmes 1998, Bierbower & Sparkes 2007). To our knowledge, whether sperm quality/quantity of males is affected by infection with an acanthella has not been tested yet. Apart from changing investment in sperm production, acanthella-infected *G. pulex* males could potentially increase their reproductive effort by pairing with more females within a given period of time. This seems possible, particularly if male moulting frequency is decreased. Indeed, *G. pulex* males cannot enter a precopulatory mate guarding while moulting and are even able to delay moulting by a few days when the guarded female is very close to lay eggs (Ward 1984). Given that moulting is a plastic phenomenon through time that can, for instance, be adjusted according to biotic conditions (e.g. the probability of being infected, see Moret et al. 2010), delaying moulting events when infected with a *P. laevis* acanthella could be advantageous to *G. pulex* males, to increase their reproductive effort. One way of reducing moulting frequency could be to decrease food intake (as in juvenile lobster, Hagerman 1983). Interestingly, a recent study showed that *G. pulex* males infected with an acanthella of *P. laevis* displayed a reduced propensity to eat compared to uninfected ones (Dianne et al. *in prep*). Future studies should investigate these physiological parameters, to accurately evaluate the probability of reproductive compensation in response to parasitism in *G. pulex*.

From the parasite point of view, we already know that acanthella-infected gammarids are less vulnerable to predation than uninfected ones (Dianne et al. 2011, Dianne et al. *in prep*). Whether this protective behaviour is a parasite or a host strategy is still unclear given that both protagonists seem to benefit from this increase in antipredatory defence. Nevertheless, regarding host reproductive behaviour, benefits to maintain reproduction although infected are more obvious for the host than for the acanthella. According to Cothran (2004), it is, however, conceivable that pairing of its host decrease predation risk by larger predatory invertebrates, although it is showed in the same study that paired gammarids are more sensitive to predation by fish than unpaired ones (but the experiment did not included refuges where pairs may hide from predators). Sparkes et al. (1996), studying

acanthocephalan-infected isopods, discussed the possibility that paired individuals use more refuges than single individuals. Although speculative, we could suggest that *P. laevis* acanthella could exploit its intermediate host compensatory responses to parasitism (i.e. maintenance of reproductive effort, reinforcing refuge use and consequently host protection), a parasite strategy that would deserve more attention in this host-parasite system (see Lefèvre et al. 2008, 2009).

Finally, in our study, we confirm that the manipulative cystacanth of *P. laevis* prevents its amphipod intermediate host *G. pulex* from pairing with a female. To our knowledge, this is the first study based on experimentally infected hosts that bring evidence of reduced reproductive effort in infected males (see, for instance, Thomas et al. 1995, Zohar & Holmes 1998, Bollache et al. 2001 et 2002, Sparkes et al. 2006, Bierbower & Sparkes 2007, Galipaud et al. 2011b for field-based studies). Bollache et al. (2001) came to the same conclusions when studying *G. pulex* males naturally-infected with a *P. laevis* cystacanth. Such reduction in pairing success has been interpreted, by the authors, as the consequence of a depletion of energetic reserves in host infected with a cystacanth. A recent study indeed showed that cystacanth-infected *G. pulex* that were experimentally infected and kept at the laboratory during parasite development are energetically depleted (glycogen and lipids contents, Dianne et al. *in prep*). Initiating pairing is energetically costly in *G. pulex* males (Plaistow et al. 2003) and this could explain why cystacanth-infected males did not attempt to pair with a female as frequently as uninfected ones. However, it has also been showed that field-collected males of *G. pulex* naturally infected with *P. laevis* had more glycogen and as much lipids as uninfected ones (Plaistow et al. 2001), a result that contradicts the hypothesis that decreased pairing success is due to energy depletion. Clearly, more studies are needed before concluding on the link between depleted energetic reserves and reduction in male pairing success. For instance, if low energetic reserves really decrease gammarids pairing success, this could potentially be observed in starved healthy amphipods too.

It has also been suggested that reduction of pairing success in cystacanth-infected males could be a side-effect of parasite-induced behavioural manipulation, such as the alteration of gammarids serotonergic neuromodulatory activity that could potentially reduce female detection in infected hosts (see Bollache et al. 2001 and references therein). Indeed, our study, together with that of Dianne et al. (*in prep*), confirm the co-occurrence of altered antipredatory defences and decreased probability of pairing, upon switching from the acanthella to the cystacanth stage. This hypothesis also fits the current view of parasitic manipulation as multidimensional (Cézilly & Perrot-Minnot 2010). Thus, it seems unlikely

that host reduction in reproductive effort has evolved as a parasite strategy in itself independently of other alterations induced by *P. laevis* cystacanths, unless *P. laevis* cystacanths take advantage of decreasing host pairing success. These evolutionary questions remain to be investigated. Similarly, it seems unlikely that host reduction in reproductive effort would be a host strategy. Generally, host reduction in reproductive effort is seen as a way to limit the negative effects of infection, for instance by increasing their own survival (i.e. modifying their life-history trade-offs) which would enhance their future reproductive effort (Forbes 1993, Hurd 2001). Such host strategy is expected to be selected in host infected by type I parasites (affecting host present reproduction more than host future reproduction, Forbes 1993). More studies are needed on the neurophysiological basis of cystacanth-induced reduction in reproductive effort of *G. pulex* males, particularly on the potential link between serotonergic neuromodulatory activity and female detection by male hosts.

To conclude, we found that reproductive effort of *P. laevis*-infected *G. pulex* vary according to the developmental stage of the parasite; acanthella-infected hosts showed a pairing success similar to that of uninfected hosts, whereas cystacanth-infected hosts were less likely to pair with a female than uninfected ones. Whether these behaviours are beneficial to the host or the parasite (or both of them) remains to be investigated, although we have recently shown that changes in host behaviour and physiology induced by the acanthella could be beneficial to both protagonists (Dianne et al. 2011, Dianne et al. *in prep*). This raises interesting evolutionary and mechanistic questions about the nature of interactions between a manipulative parasite and its intermediate host. Above all, it shows the need to take into account the whole developmental stages of parasitic larvae in the analysis of these host-parasite interactions. Studies on the effect of non-infective stages on female reproductive behaviour and physiology are also needed to conclude about the potential effect of *P. laevis* on its host populations.

Acknowledgements

We thank Sébastien Motreuil and Aude Balourdet for their technical assistance in the field and at the laboratory. We are very thankful to Matthias Galipaud that provided great help and many useful discussions regarding gammarids reproduction and Cox regressions. LD was funded by a joined doctoral grant from the CNRS and the Conseil Régional de Bourgogne.

The study was funded by a research grant (Grant n°9201/AA/O/040/S00619) from the Conseil Régional de Bourgogne.

References

Agnew, P., Koella, J.C. & Michalakis, Y. 2000. Host life history responses to parasitism. *Microbes Inf.* **2**: 891-896.

Baudoin, M. 1975. Host castration as a parasitic strategy. *Evolution* **29**: 335-352.

Bierbower, S.M. & Sparkes, T.C. 2007. Parasite-related pairing success in an intermediate host, *Caecidotea intermedius* (Isopoda): effects of male behavior and reproductive physiology. *J. Parasitol.* **93**: 445-449.

Bollache, L., Gambade, G. & Cézilly, F. 2001. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**: 296-303.

Bollache, L., Rigaud, T. & Cézilly, F. 2002. Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *J. Inv. Pathol.* **79**: 102-110.

Cézilly, F., Grégoire, A. & Bertin, A. 2000. Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study on the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology* **120**: 625-630.

Cézilly, F. & Perrot-Minnot, M.-J. 2010. Interpreting multidimensionality in parasite-induced phenotypic alterations: panselectionism versus parsimony. *Oikos* **119**: 1224-1229.

Chubb, J.C., Ball, M.A. & Parker, G.A. 2010. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends Parasitol.* **26**: 93-102.

Cothran, R.D. 2004. Precopulatory mate guarding affects predation risk in two freshwater amphipod species. *Anim. Behav.* **68**: 1133-1138.

Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Gaillard, M., Léger, E. & Rigaud, T. 2011. Protection first then facilitation: a manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. *Evolution* **65**: 2692-2698.

Dianne, L., Perrot-Minnot, M.-J., Bauer, A., Guvenatam, A. & Rigaud, T. Investigations of foraging and physiological costs resulting from parasite-induced host protection against predation. *In prep.*

Forbes, M.R.L. 1993. Parasitism and host reproductive effort. *Oikos* **67**: 444-450.

Franceschi, N., Bauer, A., Bollache, L. & Rigaud, T. 2008. The effects of parasite age and intensity on variability in acanthocephalan-induced behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **38**: 1161-1170.

Galipaud, M., Dechaume-Moncharmont, F.-X., Oughadou, A. & Bollache, L. 2011a. Does foreplay matter? *Gammarus pulex* females may benefit from long-lasting precopulatory mate guarding. *Biol. Lett.* **7**: 333-335.

Galipaud, M., Gauthey, Z. & Bollache, L. 2011b. Pairing success and sperm reserve of male *Gammarus pulex* infected by *Cyathocephalus truncatus* (Cestoda: Spathebothriidea). *Parasitology* **138**: 1429-1435.

Hagerman, L. 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Marine Biology* **77**: 11-17.

Helluy, S. & Holmes, J.C. 1990. Serotonin, octopamine, and the clinging behavior induced by the parasite *Polymorphus paradoxus* (Acanthocephala) in *Gammarus lacustris* (Crustacea). *Can. J. Zool.* **68**: 1214-1220.

Hurd, H. 2001. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trends Parasitol.* **17**: 363-368.

Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. 2007. Differential influence of two acanthocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Anim. Behav.* **74**: 1311-1317.

Laguerre, C., Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J., Motreuil, S. & Bollache, L. 2007. Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* **88**: 2839-2847.

Lafferty, K.D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitol. Today* **15**: 111-115.

Lefèvre, T., Adamo, S., Biron, D.G., Missé, D., Hughes, D. & Thomas, F. 2009. Invasion of the body snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. *Adv. Parasitol.* **68**: 45-83.

Lefèvre, T., Roche, B., Poulin, R., Hurd, H., Renaud, F. & Thomas, F. 2008. Exploiting host compensatory responses: the 'must' of manipulation? *Trends Parasitol.* **24**: 435-439.

Lemaître, J.-F., Rigaud, T., Cornet, S. & Bollache, L. 2009. Sperm depletion, male mating behaviour and reproductive time out in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). *Anim. Behav.* **79**: 911-916.

McCurdy, D.G., Forbes, M.R. & Boates, J.S. 2000. Male amphipods increase their mating effort before behavioural manipulation by trematodes. *Can. J. Zool.* **78**: 606-612.

Minchella, D.J. 1985. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology* **90**: 205-216.

Minchella, D.J. & LoVerde, P.T. 1981. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Am. Nat.* **118**: 876-881.

Moore, J. 2002. *Parasites and the behavior of animals*. Oxford University Press, New-York.

Moret, Y., Rigaud, T., Motreuil, S., Troussard, J.-P. & Moreau, J. 2010. Condition-dependent ecdysis and immunocompetence in the amphipod crustacean, *Gammarus pulex*. *Biol. Lett.* **6**: 788-791.

Parker, G.A. 1974. Courtship persistence and female-guarding as male time investment strategies. *Behaviour* **48**: 157-184.

Parker, G.A., Ball, M.A., Chubb, J.C., Hammerschmidt, K. & Milinski, M. 2009. When should a trophically transmitted parasite manipulate its host? *Evolution* **63**: 448-458.

Plaistow, S.J., Bollache, L. & Cézilly, F. 2003. Energetically costly precopulatory mate-guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Anim. Behav.* **65**: 683-691.

Plaistow, S.J., Troussard, J.-P. & Cézilly, F. 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 346-351.

Rauque, C.A. & Semenas, L. 2009. Effects of two acanthocephalan species on the reproduction of *Hyaella patagonica* (Amphipoda, Hyalellidae) in an Andean Patagonian Lake (Argentina). *J. Inv. Pathol.* **100**: 35-39.

Schmidt, G.D. 1985. Development and life cycles. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 273-305. Cambridge University Press, New-York.

Sparkes, T.C., Keogh, D.P. & Pary, R.A. 1996. Energetic costs of male guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia* **106**: 166-171.

Sparkes, T.C., Weil, K.A., Renwick, D.T. & Talkington, J.A. 2006. Development-related effects of an acanthocephalan parasite on pairing success of its intermediate host. *Anim. Behav.* **71**: 439-448.

Sutcliffe, D.W. 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum* **2**: 102-128.

Tain, L., Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. 2006. Altered host behaviour and brain serotonergic activity caused by acanthocephalans: evidence for specificity. *Proc. R. Soc. B* **273**: 3039-3045.

Thomas, F., Renaud, F., Derothe, J.M., Lambert, A., De Meeüs, T. & Cézilly, F. 1995. Assortative pairing in *Gammarus insensibilis* (Amphipoda) infected by a trematode parasite. *Oecologia* **104**: 259-264.

Thornhill, J.A., Jones, J.A. & Kusel, J.R. 1986. Increased oviposition and growth in immature *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **93**: 443-450.

Ward, P.I. 1984. *Gammarus pulex* control their moult timing to secure mates. *Anim. Behav.* **32**: 927.

Zohar, S. & Holmes, J.C. 1998. Pairing success of male *Gammarus lacustris* infected by two acanthocephalans: a comparative study. *Behav. Ecol.* **9**: 206-211.

Chapitre 3

Conflits intraspécifiques entre acanthelle
et cystacanthé de *P. laevis*

Chapitre 3

L'objectif de ce dernier chapitre était de tester l'hypothèse d'un conflit entre l'acanthelle et le cystacanthé de *P. laevis* sur la manipulation de l'hôte. En effet, la différence de maturité des deux stades larvaires implique des stratégies d'optimisation de l'aptitude phénotypique opposées. Tandis que l'acanthelle, stade non-infectieux pour l'hôte définitif poisson, accroît sa propre survie (donc ses chances d'atteindre le stade cystacanthé) en augmentant la survie de son hôte intermédiaire amphipode, le cystacanthé quant à lui manipule le comportement de l'amphipode, augmentant ainsi ses probabilités de prédation par un hôte définitif, donc sa propre transmission. A l'aide d'infestations expérimentales décalées dans le temps, nous avons obtenus des hôtes intermédiaires (*Gammarus pulex*) infectés à la fois par des stades larvaires de *P. laevis* infectieux et non-infectieux pour l'hôte définitif. L'intensité de la manipulation comportementale des gammarus bi-infectés séquentiellement (i.e. infectés par deux stades larvaires d'âges différents) a été comparée à celle des gammarus mono-infectés, bi-infectés simultanément (i.e. infectés par deux stades larvaires de même âge) et non-infectés. La manipulation du comportement des gammarus a été mesurée par leur phototactisme, c'est-à-dire leur attrait pour la lumière.

Comme observé dans une précédente étude, les gammarus mono-infectés et bi-infectés simultanément étaient de plus en plus manipulés (i.e. photophiles) au cours du temps. A l'inverse, comme chez les gammarus non-infectés, le patron de manipulation comportementale des gammarus bi-infectés séquentiellement était stable dans le temps. La manipulation exercée par un cystacanthé et une acanthelle sur leur hôte était donc intermédiaire, significativement supérieure au phototactisme des gammarus non-infectés et inférieure à celle des gammarus infectés par deux cystacanthés de même âge. Il est intéressant de noter que chez les hôtes bi-infectés séquentiellement, la manipulation de l'hôte n'était pas rétablie lorsque le deuxième parasite (le plus jeune) était à son tour devenu infectieux pour l'hôte définitif.

Ces résultats n'ont pas permis de vérifier l'hypothèse du sabotage, par l'acanthelle, de la manipulation induite par le cystacanthé de *P. laevis*, bien que la présence de l'acanthelle ne soit pas neutre dans l'exercice de cette manipulation par le cystacanthé. Les hôtes infectés par un cystacanthé et une acanthelle ont montré une dynamique stable de phototactisme dans le temps, suggérant que l'acanthelle est quand même en mesure de retarder la manipulation exercée par un cystacanthé partageant le même hôte intermédiaire. Ceci est potentiellement dû

à une compétition entre les deux altérations du comportement de l'hôte opposées exercées par l'acanthelle et le cystacanthé. Le fait qu'un hôte infecté par deux cystacanthes d'âges différents (i.e. l'acanthelle est récemment devenue infectieuse pour l'hôte définitif) n'est pas aussi manipulé qu'un hôte infecté par deux cystacanthes de même âge révèle une potentielle compétition à long terme entre ces deux altérations antagonistes. D'un point de vue fonctionnel, cela pourrait suggérer des produits antagonistes de la part des acanthelles et des cystacanthes ayant une cible commune dans le système nerveux central des gammarés et impliquant des répercussions à long terme sur la physiologie de l'hôte.

Article 4

Dianne, L., Rigaud, T., Léger, E., Motreuil, S., Bauer, A. & Perrot-Minnot, M.-J. 2010. Intraspecific conflict over host manipulation between different larval stages of an acanthocephalan parasite. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2648-2655.

Intraspecific conflict over host manipulation between different larval stages of an acanthocephalan parasite

L. DIANNE, T. RIGAUD, E. LÉGER, S. MOTREUIL, A. BAUER & M.-J. PERROT-MINNOT

UMR CNRS 5561, Laboratoire Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

Keywords:

apparent competition;
coinfection;
mixed larval infection;
parasite manipulation;
phototaxis;
Pomphorhynchus;
tragedy of the common.

Abstract

Competitive interactions between coinfecting parasites are expected to be strong when they affect transmission success. When transmission is enhanced by altering host behaviour, intraspecific conflict can lead to 'coinfection exclusion' by the first-in parasite or to a 'sabotage' of behavioural manipulation by the youngest noninfective parasite. We tested these hypotheses in the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis*, reversing phototaxis in its intermediate host *Gammarus pulex*. No evidence was found for coinfection exclusion in gammarids sequentially exposed to infection. Behavioural manipulation was slightly weakened but not cancelled in gammarids infected with mixed larval stages. Therefore, coinfecting infective and noninfective larvae both suffered competition, potentially resulting in delayed transmission and increased risk of mortality, respectively. Consequently, noninfective larva is not just a 'passive passenger' in the manipulated host, which raises interesting questions about the selective pressures at play and the mechanisms underlying manipulation.

Introduction

Intraspecific or interspecific antagonism in resource exploitation arises from either joint use (competition) or distinct and incompatible uses of a common resource. Under particular conditions, exploitation of a common resource can also promote cooperation and increase the per capita profitability of the resource. In host–parasite systems, the 'host as a resource' generally provides multiple services for parasites, notably nutrients and habitat. It is also used as a 'vehicle' for transmission (see the 'host-as-vehicle' analogy of Lafferty, 1999 and Lafferty *et al.*, 2000), particularly by parasites with complex life cycles. The conditions for antagonism and cooperation to evolve between such parasites when they exploit a common host may therefore be broader and more diverse than in typical cases of competition simply for food or mates.

Mixed infections involving at least two species of parasites (heterospecific infections) or two strains (mono-

specific infections) are common in nature (Read & Taylor, 2001). Apart from competition for establishment, growth or reproduction (Parker *et al.*, 2002; Lively, 2009; Mideo, 2009), one obvious opportunity for antagonism over host exploitation lies in the different optimal strategies for transmission of parasite individuals or species. Coinfecting parasites may have divergent interests over the optimal timing or place to be to reach their next hosts or in the optimal level of virulence. Such evolutionary conflicts have been studied predominantly in 'manipulative' parasites with complex life cycles, which induce phenotypic changes in their intermediate host in ways that increase the probability of completing their life cycle, a phenomenon called 'behavioural manipulation' (see Moore, 2002 for a review). For instance, many trophically transmitted parasites enhance their intermediate host vulnerability to predation by final hosts, especially by altering their host's anti-predatory defences. Increasing the probability of trophic transmission to a final host by infective parasites is a highly virulent exploitation strategy, which may be in complete contradiction with another coinfecting parasite species targeting a different final host.

Lafferty *et al.* (2000) identified at least three outcomes of interspecific conflicts between parasites sharing a

Correspondence: Lucile Dianne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.
Tel.: +33 3 80 39 39 45; fax: +33 3 80 39 62 31;
e-mail: lucile.dianne@u-bourgogne.fr

common intermediate host but targeting different definitive hosts: (i) avoiding intermediate hosts already manipulated by another parasite; (ii) destroying the manipulator; or (iii) overpowering it to either manipulate the host in a different way ('hijacking', Lafferty *et al.*, 2000) or to neutralize manipulation ('sabotage', Thomas *et al.*, 2002). This latter outcome has been observed for instance between the vertically transmitted microsporidia *Dictyocoela* sp. and the acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus*, coinfecting the amphipod *Gammarus roeseli* (Haine *et al.*, 2005). Such scenarios are also relevant to intraspecific conflicts in manipulative parasites when larvae at different levels of maturity infect the same intermediate host, specifically when one parasite is infective for the next host in the life cycle whereas its coinfective conspecific is not. For a parasite, reaching its next host as soon as it is infective is selectively advantageous in terms of generation time and survival probability (Lafferty, 1992; Parker *et al.*, 2009); therefore, an optimal timing for inducing manipulation has been selected (Franceschi *et al.*, 2008; Hammerschmidt *et al.*, 2009). On the contrary, a parasite not yet infective would benefit from the increased survival of its host, thus from protecting it against all forms of predation (Hammerschmidt *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2009). We therefore expect conflicting selection pressures on distinct parasite larval stages, relating to suppression vs. enhancement of predation upon their shared intermediate host.

We addressed the occurrence of such an intraspecific conflict over manipulation between different larval stages of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* coinfecting the intermediate host *Gammarus pulex*. Once ingested, the *P. laevis* egg develops in the haemocoel through several stages of acanthella before reaching the cystacanth stage which is infective to several freshwater fish species (Kennedy, 2006). The onset of behavioural manipulation in infected *G. pulex* occurs when the cystacanth is formed, as evidenced by the reversal from natural photophobia to attraction to light at that stage of parasite development (Franceschi *et al.*, 2008). Sequential coinfections of *G. pulex*, resulting in the coexistence of acanthellae and cystacanths in the same individual, have already been observed in nature (M.-J. Perrot-Minnot, personal communication). In addition, immunosuppression of *G. pulex* infected with *P. laevis* cystacanth (Rigaud & Moret, 2003; Cornet *et al.*, 2009) may facilitate sequential coinfection. Opportunities for intraspecific conflicts over manipulation may therefore be common enough for adaptive strategies to evolve. The acanthella should be selected to prevent their death by premature transmission to the definitive host by counteracting the behavioural switch induced by a cystacanth, a strategy referred to as 'sabotage' (Thomas *et al.*, 2002). On the other hand, the cystacanth should be selected to prevent this sabotage by a superinfecting acanthella, possibly by preventing establishment of a conspecific intruder, a strategy of 'coinfection exclusion'.

One would expect the 'sabotage' strategy of the acanthella to lead to two behavioural measures of conflict: (i) behavioural manipulation of hosts coinfecting with both larval stages should be lower than that of hosts infected with cystacanths only, possibly as weak as uninfected hosts; (ii) once the acanthella becomes a cystacanth, the manipulation level of sequentially coinfecting hosts should be as strong as the manipulation level of hosts infected with cystacanths only. The alternative strategy of 'coinfection exclusion' by the cystacanth should lower the rate of subsequent infection success in gammarids re-exposed to *P. laevis* eggs, after a first successful infection.

In this study, we first compared phototaxis of field-collected gammarids naturally infected with cystacanths only, to gammarids coinfecting with one or more cystacanths and acanthella. Then, using experimental infection in the laboratory, we compared the temporal patterns of behavioural manipulation of sequentially bi-infected hosts and hosts infected once. We also compared *P. laevis* infection success (prevalence and parasite load) in sequential coinfections to the success of single infections.

Materials and methods

Behaviour of field-collected gammarids

Gammarus pulex were collected by kick sampling every 2 months from late March 2004 to early August 2005, in a locality on the Ouche River where *P. laevis* and *Pomphorhynchus tereticollis* species are present (Parc de la Colombière, Burgundy, Eastern France, 47°17'50.62"N; 5°2'35.85"E). Both fish parasite species alter the reaction to light of *G. pulex* (Tain *et al.*, 2006) but *P. tereticollis* may exhibit more seasonality in the intensity of behavioural manipulation and is also much less prevalent in this locality (M.-J. Perrot-Minnot, unpublished data; Perrot-Minnot, 2004). Gammarids were visually inspected to select individuals infected with *P. laevis* cystacanths (with or without an acanthella) and uninfected individuals. We analysed only animals infected with one or two cystacanths (gammarids with heavier parasite loads were much rarer). Phototaxis was measured within a week of collection, following the protocol of Perrot-Minnot (2004). Individual reaction to light was scored in a 5-min choice test by recording the amphipod's position in the dark or the light side of a tube every 30 s. For each individual, phototaxis summed scores ranged from 0 (highly photophobic) to 10 (highly photophilic) (Perrot-Minnot, 2004). Dissection under a binocular microscope was used to confirm the infection status of each individual.

Experimental study

Two 4-week staggered exposures of *G. pulex* to *P. laevis* eggs were performed to obtain a sequential infection with

larval stages of different maturity levels (cystacanth and acanthella) in the same host. Then, host behavioural manipulation was measured by recording *G. pulex* reaction to light. The first experimental infection is thereafter called 'i1' and the second experimental infection 'i2' (Fig. 1).

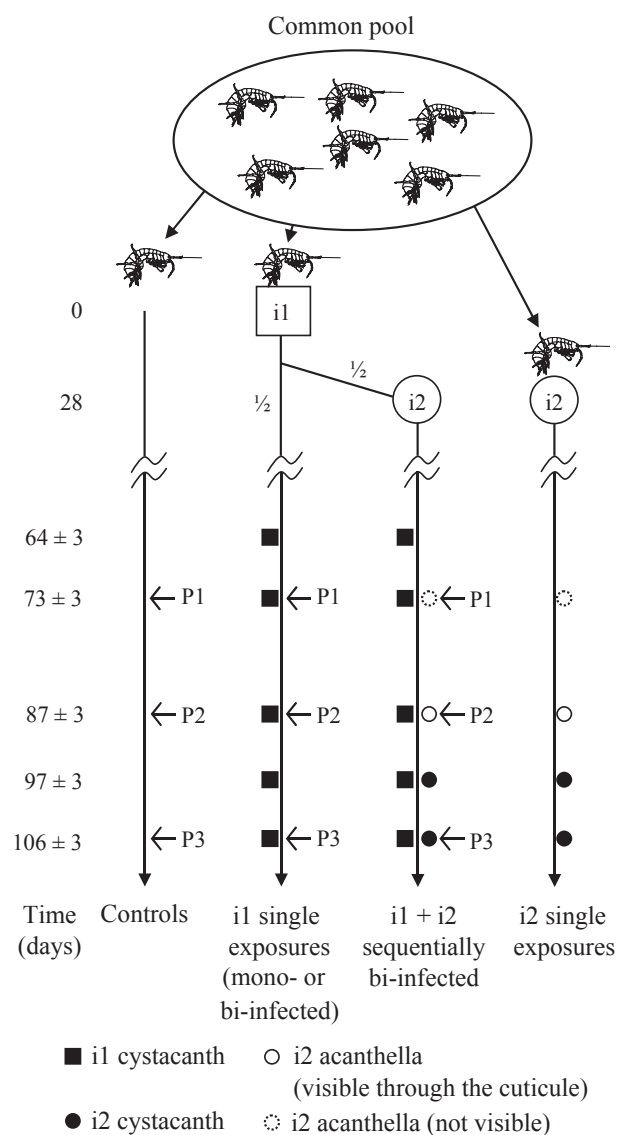


Fig. 1 Flow chart showing the timing of experimental infections of *Gammarus pulex* with *Pomphorhynchus laevis*, of *P. laevis* development and of behavioural measurement. *P. laevis* developmental stages are either infective to the definitive host (cystacanth) or noninfective (acanthella). Arrows identify the three repeated measures of phototaxis, P1, P2, P3, on infected (i1 singly exposed gammarids that are mono or bi-infected, and i1 + i2 sequentially infected gammarids) and uninfected gammarids (controls). Time in days is given ± SEM. (behaviour was recorded at the suitable stage of parasite development).

Experimental infections

Gammarus pulex were exposed to parasites following the procedure of Franceschi *et al.* (2008). Briefly, parasite eggs were retrieved from females collected in the intestine of chub (*Leuciscus cephalus*) caught in the Vouge River (47°08'03.65"N; 5°10'45.61"E). Eggs used in the first and the second infection were collected in December 2008 and January 2009, respectively. Molecular identification of parasites was performed based on size polymorphism of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) rDNA gene, following Franceschi *et al.* (2008). We used 7 *P. laevis* females from 5 different fish for the first experimental infection and 10 *P. laevis* females from 5 different fish for the second experimental infection.

Gammarus pulex used for experimental infections were collected in December 2008 in a small tributary of the Suzon River, Burgundy, eastern France (47°24'12.6"N; 4°52'58.2"E). They were acclimated in the laboratory for 15 days pre-exposure in dechlorinated, UV-treated and aerated tap water at a temperature of 15 ± 1 °C, under a 12 : 12 h light : dark cycle. Throughout the experiment, gammarids were fed with conditioned elm leaves. Male gammarids were given a 1 cm² piece of elm leaf on which a parasite eggs suspension had been deposited. After 48 h, the gammarids were rinsed and placed in groups of 10 individuals in aquaria of 0.5 L. For the i1 exposure, a dose of 100 eggs per gammarid was used. Based on previous observations, we expected this dose to give the number of mono- and bi-infected gammarids necessary to compare simultaneously bi-infected gammarids (two cystacanths from i1) to sequentially bi-infected gammarids (one cystacanth from i1 and one acanthella from i2). For i2, an exposure dose of 50 eggs per gammarid was used, because this dose increases the proportion of mono-infected gammarids relative to pluri-infected gammarids (Franceschi *et al.*, 2008), thus the number of sequentially bi-infected gammarids with only one acanthella from i2. Half of the gammarids from i1 was re-exposed to parasite eggs from i2, whereas the other half was maintained with a single exposure (Fig. 1). *Gammarus pulex* unexposed to parasite eggs but maintained under the same conditions as the exposed ones were used as controls. From the sixth week post-exposure, all gammarids were inspected once a week under a dissecting microscope to detect the presence of parasites. Larval parasites can be detected through the host cuticle from the late acanthella stage of their development. We carefully monitored parasite development as soon as the acanthellae from i1 were detected (translucent light-orange and shapeless larval stage). Infected and control gammarids were then isolated in plastic dishes of 0.2 L filled with dechlorinated, oxygenated and UV-treated tap water at 15 ± 1 °C. Parasite development was followed twice a week to record the day the parasite switched from acanthella to cystacanth. Developmental time was recorded as the time lapse in days between the day of exposure and the day the

parasite reached the cystacanth stage. Development of i2 parasites was monitored in the same way.

Behavioural measurements

Reaction to light of isolated individuals was measured as previously described. To estimate when the possible behavioural switch in infected gammarids occurs, three repeated measures of phototaxis were carried out over the course of parasite development (Fig. 1). Phototaxis was first measured 9 days after the appearance of cystacanth in i1 (P1, Fig. 1). The second behavioural measure P2 was performed as soon as the i2 acanthellae were detected through the host cuticle. The third phototaxis measure on the same individuals was performed about 9 days after i2 parasites in sequentially infected gammarids developed into cystacanths (P3, Fig. 1). At the end of these behavioural assays, gammarids were dissected and parasites were counted.

Statistical analyses

Phototaxis score data were analysed using nonparametric tests, because data did not meet homoscedasticity conditions even after transformation. Prevalences and parasite loads associated to i1 and i2 experimental infections were compared using Fisher exact test (two-tailed) and Mann–Whitney test (two-tailed), respectively. Mann–Whitney two-tailed test with normal approximation for large samples was used for pairwise comparisons. When necessary, we corrected for multiple testing by applying the Šidák correction to derive threshold probability for individual tests (Sokal & Rohlf, 1995). The timing of behavioural manipulation in experimentally infected gammarids was analysed using Friedman tests. Statistical analyses were performed using JMP software version 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA), except Friedman tests which were carried out using R software version 2.11.1 (R Development Core Team, www.r-project.org).

Results

Behaviour of field-collected gammarids

Overall, 4082 gammarids were dissected, among which 393 were parasitized by one or two *P. laevis* cystacanth. Because we intentionally collected gammarids with visual signs of infection, this rate is much higher than the natural prevalence of *P. laevis* (0.4–0.7%) recorded in this population in 2004–2005 (Laguerre *et al.*, 2007; M.-J. Perrot-Minnot, unpublished data). Among hosts harbouring one or two cystacanth(s), 24 were coinfecting with one acanthella. The phototaxis score of infected animals was compared to that of 423 uninfected gammarids.

Gammarids coinfecting with one acanthella and one cystacanth did not differ significantly in their reaction to light from gammarids infected with one cystacanth

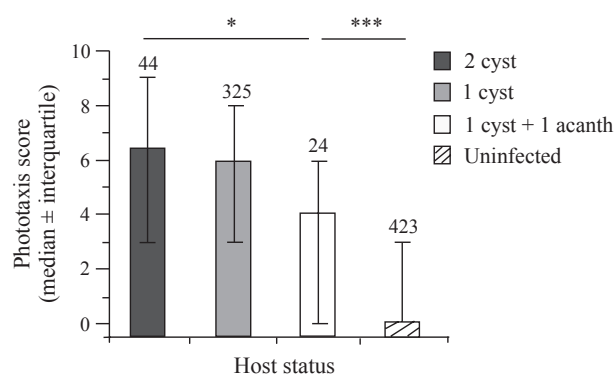


Fig. 2 Phototaxis of naturally infected *Gammarus pulex* collected in the field, according to host infection status: Infected with one cystacanth or two cystacanths of *Pomphorhynchus laevis*, coinfecting with one cystacanth of *P. laevis* and one acanthella or uninfected. Bars connected are significantly different after a Mann–Whitney U test (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). Sample size is indicated above bars.

(Mann–Whitney two-tailed test: $Z = -2.24$, $P = 0.025$, which was nonsignificant after Šidák correction), although they were 33% more photophobic (Fig. 2). However, they were significantly more photophobic than gammarids infected by two cystacanths, but not as photophobic as uninfected ones ($Z = -2.49$, $P = 0.013$, and $Z = 3.52$, $P = 0.0004$, respectively; these differences remained significant after Šidák correction) (Fig. 2).

Experimental infections

The prevalence of primary infection of healthy gammarids exposed to parasite eggs (proportion of gammarids infected with one or more cystacanth) did not differ significantly between the two experimental exposures i1 and i2 (Table 1a, b). Nor for experimental exposure i2 did prevalence differ between new primary infections of gammarids and sequential infections of superparasitized gammarids (Table 1a, b). In addition, i2 prevalence was comparable in gammarids for which i1 failed (exposed to i1 but not infected) and in singly exposed gammarids (Table 1a, b).

Parasite load after i2 single exposure was significantly lower than that after i1 first exposure (Table 1b), confirming the effect of egg exposure dose (50 eggs per gammarid in i2 vs. 100 eggs in i1). Mean load of i2 parasites developing to the cystacanth stage did not differ between previously unexposed and previously infected or exposed hosts (i.e. those for which the initial i1 infection failed) (Table 1a, b). Finally, developmental time of i2 parasites when developing alone or as a superinfection was comparable (Table 1b).

For gammarids infected at i1 that harboured one or two cystacanths, a significant increase in phototaxis was observed as the cystacanth matured (respectively Friedman test: $\chi^2 = 22.26$, $P < 0.0001$; $\chi^2 = 21.26$, $P < 0.0001$; Fig. 3). By contrast, phototaxis score was

Table 1 Infection success of *Pomphorhynchus laevis* in *Gammarus pulex* following two independent experimental infections in the laboratory. Infection success was measured as the prevalence (proportion of gammarids harbouring one or more cystacanth(s)), the parasite load (median and quartiles of the number of parasites in infected hosts) and the parasite developmental time (median and quartiles of the interval from exposure to parasite eggs to the formation of a cystacanth, in days). (a) Infection success is given for four distinct infection states, according to the number of time gammarids were exposed to eggs: once for [1] and for [2], twice for sequentially bi-infected hosts in which i1 succeeded [3] or failed [4]. (b) Statistical analysis of infection success in paired comparisons, according to host status (see text for details).

Host status	<i>N</i>	Prevalence (%)	Parasite load*	<i>N</i>	Developmental time (days)*
(a)					
[1] i1 first exposure	280	37.2	2 [1–3]	279	64 [63–67]
[2] i2 first exposure	24	36.4	1 [1–2]	23	70 [63–70]
[3] sequential superinfection (i1 + i2)	91	27.2	1 [1–2]	69	67 [67–67]
[4] i2 exposure of i1 exposed gammarids in which i1 failed	72	26.9	1 [1–3]	70	67 [67–70]
	Prevalence	Parasite load		Developmental time	
Paired comparisons according to host status	<i>P</i> -value	<i>Z</i>	<i>P</i> -value	<i>Z</i>	<i>P</i> -value
(b)					
[1] vs. [2]	0.99	−3.45	0.0006	3.88	0.0001
[2] vs. [3]	0.14	−0.88	0.38	0.52	0.60
[2] vs. [4]	0.13	−1.51	0.13	−0.47	0.63

*Interquartiles are written in square brackets.

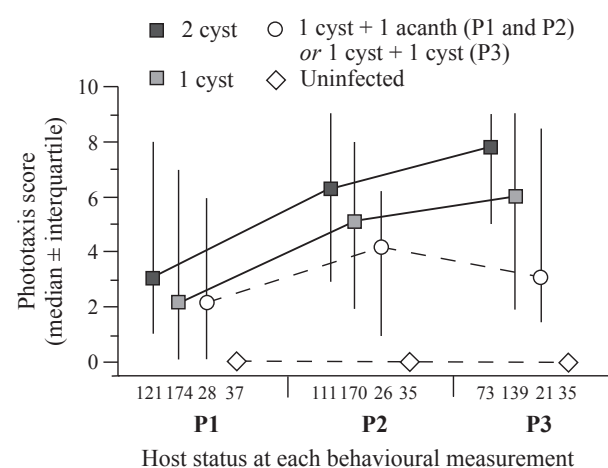


Fig. 3 Phototaxis scores of experimentally infected *Gammarus pulex* according to host infection status and parasite developmental stage. Phototaxis of sequentially bi-infected gammarids (1 cyst + 1 acanth) is compared to that of mono-infected gammarids (1 cyst), of simultaneous bi-infected gammarids (2 cyst) and of uninfected gammarids. P1, P2 and P3 refer to the timing of the phototaxis test and therefore to the age of the parasites (see Fig. 1). Full lines connecting symbols indicate a significant increase in phototaxis scores over time, unlike symbols connected by dotted lines, which show a stable pattern of phototaxis scores after a Friedman test. Sample sizes are indicated below X-axis.

stable over time in sequentially bi-infected gammarids (Friedman test: $\chi^2 = 2.78$, $P = 0.24$; Fig. 3) and in healthy ones (Friedman test: $\chi^2 = 0.78$, $P = 0.67$; Fig. 3).

To assess the 'sabotage' hypothesis, we compared the phototaxis score of sequentially bi-infected gammarids

(i1 + i2) to phototaxis score of i1 gammarids infected with one or two cystacanth(s) on the one hand and to phototaxis score of uninfected gammarids on the other hand. Sequentially bi-infected gammarids were not significantly more photophobic than i1 exposed gammarids harbouring one cystacanth, regardless of the developmental stage of the i2 parasite (Mann-Whitney tests: $Z = -0.09$, $P = 0.93$ at P1; $Z = -1.09$, $P = 0.27$ at P2; $Z = -1.03$, $P = 0.3$ at P3; Fig. 3). However, sequentially bi-infected gammarids were significantly more photophobic than i1 singly exposed gammarids harbouring two cystacanths when i1 cystacanths were at their intermediate developmental stage (at P2) (Mann-Whitney test: $Z = -2.44$, $P = 0.01$, significant after Šidák correction) but neither earlier ($Z = -1.09$, $P = 0.27$ at P1) nor later ($Z = -1.97$, $P = 0.049$, nonsignificant after Šidák correction) (Fig. 3). Sequentially bi-infected gammarids were significantly less photophobic than uninfected ones, regardless of the developmental stage of the i2 parasite (Mann-Whitney tests: all $P < 0.0001$; all remained significant following Šidák correction; Fig. 3). The same goes for gammarids first exposed at i2 when infected by a young cystacanth (at P3) ($N = 15$, median and interquartiles = 5 [2–8], Mann-Whitney test: $Z = 5.19$, $P < 0.0001$, significant after Šidák correction, data not shown).

Discussion

A conflict between acanthella and cystacanth over behavioural manipulation is expected based on opposite implications of predation of the intermediate host (death for the former vs. possible transmission for the latter).

Such a conflict can lead to either a 'sabotage' of behavioural manipulation by the acanthella or to 'coinfection exclusion' by the cystacanth.

Experimentally, *P. laevis*-infected *G. pulex* were no less or more susceptible to a second infection than were uninfected gammarids. Therefore, we have no evidence for exclusion of a second intruder by the established cystacanth. Nor could we detect a role of immunosuppression of *G. pulex* by acanthella of *P. laevis* in determining infection success of *P. laevis*. Previous studies showed that immunosuppression of *G. pulex* by *P. laevis* occurs (Rigaud & Moret, 2003; Cornet *et al.*, 2009), but our current results suggest it is either not induced before the cystacanth stage or that the *P. laevis*-induced proPO immunosuppression is not involved in *G. pulex* defence against *P. laevis* larvae. The onset of pro-PO immunosuppression in the course of *P. laevis* development should be established. Furthermore, developmental time of the second parasite appeared not affected by previous infection with an older parasite, in contrast with previous studies on cestodes (Jäger & Schjörring, 2006).

Concerning the sabotage of behavioural manipulation, reactions to light of naturally infected and laboratory-infected gammarids were quite similar. In both types of hosts, sequentially bi-infected *G. pulex* were less photophobic than uninfected ones and therefore remained partially manipulated. The 33% increase in gammarid photophobia when harbouring an acanthella in addition to the original cystacanth was not statistically significant. Therefore, we have no clear and strong evidence for the sabotage hypothesis in *P. laevis*. Nevertheless, the presence of an immature stage of larval parasite was not neutral for its more mature conspecific. First, *G. pulex* infected with an acanthella and a cystacanth were significantly more photophobic than gammarids infected with two cystacanths, a difference that could nevertheless be because of the cystacanth load. In addition, phototaxis scores in gammarids harbouring both an acanthella and a cystacanth did not increase as the cystacanth matured, whereas they did in mono-infected and simultaneously bi-infected gammarids (as previously observed by Franceschi *et al.*, 2008). This stable pattern over time at an intermediate level of manipulation indicates that the presence of an acanthella slightly decreased or delayed the behavioural manipulation of cystacanth-infected hosts. Note that this temporal pattern could not be investigated with naturally infected hosts. The temporal dynamic of manipulation thus seems to be a key parameter in the competitive interaction between the acanthella and the cystacanth; it may 'take time' for a parasite to reverse phototaxis, and manipulation could be either accelerated by a coinfecting cystacanth or delayed by a coinfecting acanthella. To our knowledge, the only other study to address sabotage in mixed larval stages infection failed to find it. Indeed, Sparkes *et al.* (2004) showed that the acanthella of the acanthocephalan parasite *Acantocephalus dirus* was unable to lessen the

alteration of host phenotype induced by the cystacanth consisting in a nearly complete depigmentation of the isopod body. However, these authors considered a phenotypic alteration that is already partially occurring at the acanthella stage, although less pronounced than at the cystacanth stage (the colour change induced by the acanthella and the cystacanth ranged from over 40% to over 80% of the body, respectively). A suppression of manipulation would therefore seem unlikely, whereas in our model system, *P. laevis* acanthella alone did not induce any change in phototaxis (Franceschi *et al.*, 2008).

Despite the absence of complete sabotage, our study nevertheless shows that the acanthella is not a passive 'passenger' in its intermediate host, with respect to host behaviour. It disrupts or delays, albeit weakly, the manipulative effect of a mature cystacanth. This disturbance may result from a type of apparent competition between the acanthella and the cystacanth (Mideo, 2009), in which each conspecific protagonist indirectly decreases the fitness payoff of host exploitation by the other. The host offers a variety of resources prone to a 'tragedy of the common' for coinfecting parasites, most commonly addressed in the case of within-host competition for nutrients (Parker *et al.*, 2002; Rankin *et al.*, 2007; Lively, 2009; Mideo, 2009). Was the pattern of competition between acanthella and cystacanth reported here 'tragic'? A general criterion for a 'tragedy of the common' to occur is the decreased overall fitness of the group following to selfish competition. Franceschi *et al.* (2010) showed that gammarids have a decreased survival probability once infected by *P. laevis*; staying for a longer time in the intermediate host is therefore costly for the parasite. In addition, the acanthella lacks several anatomical (proboscis muscles) and physiological (glycogen reserves) attributes necessary for establishing successfully in its definitive host (see Nickol, 1985; Taraschewski, 2000), thus being ingested by a fish is costly for *P. laevis* at that stage. If the intermediate level of behavioural manipulation in sequentially coinfecting hosts translates into an intermediate level of exposure to predators, it may diminish the individual payoffs of both acanthella and cystacanth in terms of survival. While this direct link between intensity of manipulation and intensity of predation should be quantified specifically (Cézilly *et al.*, 2010), this hypothesis is realistic because exposure to light should make the infected gammarids more visible to fish predators foraging in the river current.

The absence of a complete counteracting effect of an acanthella on cystacanth-induced manipulation raises the question of whether selection pressure is strong enough for sabotage to evolve. Selection pressure could be weak because of a low risk of experiencing the cystacanth-acanthella conflict. This risk diminishes at low prevalence, because the chances of coinfection with mixed larval stages decrease as parasite prevalence decreases. Prevalence is indeed a key parameter for sabotage to evolve (Thomas *et al.*, 2002) and more

generally for the evolution of strategies that optimize parasite transmission (Thomas *et al.*, 1998). *Pomphorhynchus laevis* prevalence in the populations sampled could have been too variable and/or too weak to induce a selection pressure high enough for adaptive strategies to fully evolve in response to such a conflict. The lack of complete sabotage by the acanthella and the lack of coinfection exclusion from the cystacanth reported here are consistent with this interpretation. However, the fact that the acanthella is not a 'passive passenger' raises the question of whether the observed competition between the two larval stages is a by-product of two opposing manipulations. Parker *et al.* (2009) and Hammerschmidt *et al.* (2009) showed that there is a strong selective pressure on manipulative parasites to 'actively' protect their host from predation before maturation and then to switch to an increased predation after maturation. These opposite behavioural manipulations should be achieved even in absence of interaction between parasites. In mixed larval stage infections, these two antagonistic manipulations could be in conflict, leading to an intermediate phenotype. According to our results, sequentially bi-infected gammarids harbouring two cystacanths were still slightly more photophobic than gammarids infected by two cystacanths of the same age, a difference that was close to significance. From a functional viewpoint, this long-lasting disturbance of cystacanth-induced behavioural manipulation by the younger parasite suggests profound modifications of the host's brain, and potentially an important time lapse to recover from them. Reversed phototaxis of *G. pulex* infected by cystacanths of *P. laevis* is related to an important increase in immunoreactivity to serotonin (5-HT) in the host brain (Tain *et al.*, 2006). The possibility that the targets of the acanthella and the cystacanth in the crustacean central nervous system experience competitive interactions at the molecular level between antagonistic products of acanthella and cystacanth, such as 5-HT receptors or 5-HT transporters, therefore appears to be an interesting perspective.

Acknowledgments

LD benefited from a doctoral grant co-funded by the CNRS and the Conseil Régional de Bourgogne. This work was supported by the ANR (grant BLAN07-3_183300) and by the Conseil Régional de Bourgogne (grant 9201AAO040S00619) to TR and MJPM. We thank Laurent Billot for his helpful corrections on an earlier version of the manuscript, and J. Shykoff and two anonymous referees for their useful comments.

References

Cézilly, F., Thomas, F., Médoc, V. & Perrot-Minnot, M.-J. 2010. Host-manipulation by parasites with complex life cycles: adaptive or not? *Trends Parasitol.* **26**: 311–317.

- Cornet, S., Franceschi, N., Bauer, A., Rigaud, T. & Moret, Y. 2009. Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **39**: 221–229.
- Franceschi, N., Bauer, A., Bollache, L. & Rigaud, T. 2008. The effects of parasite age and intensity on variability in acanthocephalan-induced behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **38**: 1161–1170.
- Franceschi, N., Cornet, S., Bollache, L., Dechaume-Moncharmont, F.X., Bauer, A., Motreuil, S. & Rigaud, T. 2010. Variation between populations and local adaptation in acanthocephalan-induced parasite manipulation. *Evolution* **64**: 2417–2430.
- Haine, E.R., Boucansaud, K. & Rigaud, T. 2005. Conflict between parasites with different transmission strategies infecting an amphipod host. *Proc. Biol. Sci.* **272**: 2505–2510.
- Hammerschmidt, K., Koch, K., Milinski, M., Chubb, J. & Parker, G.A. 2009. When to go: optimization of host switching in parasites with complex life cycles. *Evolution* **63**: 1976–1986.
- Jäger, I. & Schjørring, S. 2006. Multiple infections: relatedness and time between infections affect the establishment and growth of the cestode *Schistocephalus solidus* in its stickleback host. *Evolution* **60**: 616–622.
- Kennedy, C.R. 2006. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lafferty, K.D. 1992. Foraging on preys that are modified by parasites. *Am. Nat.* **140**: 854–867.
- Lafferty, K.D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitol. Today* **15**: 111–115.
- Lafferty, K.D., Thomas, F. & Poulin, R. 2000. Evolution of host-phenotype manipulation by parasites and its consequences. In: *Evolutionary Biology of Host-Parasite Relationships: Theory Meets Reality* (R. Poulin, S. Morand & A. Skorping, eds), pp. 117–127. Elsevier, Amsterdam.
- Laguerre, C., Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J., Motreuil, S. & Bollache, L. 2007. Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* **88**: 2839–2847.
- Lively, C.M. 2009. Local host competition in the evolution of virulence. *J. Evol. Biol.* **22**: 1268–1274.
- Mideo, N. 2009. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends Parasitol.* **25**: 261–268.
- Moore, J. 2002. *Parasites and the Behavior of Animals*. Oxford University Press, New York.
- Nickol, B.B. 1985. Epizootiology. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 307–346. Cambridge University Press, Cambridge.
- Parker, G.A., Chubb, J.C., Roberts, G.N., Michaud, M. & Milinski, M. 2002. Optimal growth strategies of larval helminths in their intermediate hosts. *J. Evol. Biol.* **16**: 47–54.
- Parker, G.A., Ball, M.A., Chubb, J.C., Hammerschmidt, K. & Milinski, M. 2009. When should a trophically transmitted parasite manipulate its host? *Evolution* **63**: 448–458.
- Perrot-Minnot, M.-J. 2004. Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Int. J. Parasitol.* **34**: 45–54.
- Rankin, D.J., Bargum, K. & Kokko, H. 2007. The tragedy of the commons in evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* **22**: 643–651.

- Read, A.F. & Taylor, L.H. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* **292**: 1099–1102.
- Rigaud, T. & Moret, Y. 2003. Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression? *Parasitology* **127**: 571–577.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1995. *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edn. W. H. Freeman and Co, New York.
- Sparkes, T.C., Wright, V.M., Renwick, D.T., Weil, K.A., Talkington, J.A. & Milhalyov, M. 2004. Intra-specific host sharing in the manipulative parasite *Acanthocephalus dirus*: does conflict occur over host modification? *Parasitology* **129**: 335–340.
- Tain, L., Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. 2006. Altered host behaviour and brain serotonergic activity caused by acanthocephalans: evidence for specificity. *Proc. Biol. Sci.* **273**: 3039–3045.
- Taraschewski, H. 2000. Host-parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. *Adv. Parasitol.* **46**: 1–179.
- Thomas, F., Renaud, F. & Poulin, R. 1998. Exploitation of manipulators: “hitch-hiking” as a parasite transmission strategy. *Anim. Behav.* **56**: 199–206.
- Thomas, F., Fauchier, J. & Lafferty, K.D. 2002. Conflict of interest between a nematode and a trematode in an amphipod host: test of the “sabotage” hypothesis. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51**: 296–301.

Received 19 May 2010; revised 13 August 2010; accepted 31 August 2010

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était de montrer que l'évaluation de l'aptitude phénotypique d'un parasite peut être incomplète et erronée, par le simple fait que le cycle de vie parasitaire n'est pas souvent pris en compte dans son intégralité. L'aptitude phénotypique d'un parasite adulte résulte effectivement des nombreux compromis évolutifs subis dès le début du cycle parasitaire, notamment lors du développement larvaire. La fécondité des parasites adultes est ainsi souvent reliée à leur croissance au stade larvaire (e.g. Brown et al. 2003, Fredensborg & Poulin 2005). Cette croissance larvaire dépend de nombreux facteurs biotiques (caractéristiques de l'hôte et d'éventuels conspécifiques en co-infection) et abiotiques (environnement de l'hôte), ainsi que des stratégies évolutives en résultant. Dans ce cadre, je me suis intéressée au cas du parasite acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis*, ayant la capacité de manipuler le comportement de son hôte intermédiaire amphipode, *Gammarus pulex*. Plus particulièrement, je souhaitais montrer qu'au sein de cette relation hôte-parasite, le stade larvaire non-infectieux pour l'hôte définitif, l'acanthelle, a trop souvent été occulté ; les études précédentes ont probablement préféré s'attacher à décrire l'évolution de stratégies parasitaires *a priori* plus étonnantes et « percutantes » – dans ce cas, la manipulation du comportement de l'hôte exercé par les stades larvaires infectieux pour l'hôte suivant (le cystacanthe de *P. laevis*).

1. Effet protecteur de l'infection par une acanthelle : caractéristiques et hypothèses sur son évolution

Caractéristiques générales de l'effet protecteur

Dans le chapitre 1 (article 1), nous avons montré que l'acanthelle du parasite acanthocéphale *P. laevis* renforce l'une des composantes du comportement anti-prédateur de son hôte intermédiaire amphipode. En effet, un hôte infecté par une acanthelle utilise davantage les refuges disponibles dans l'environnement qu'un hôte non-infecté. De plus, en présence d'un signal de prédateur dans l'environnement, les gammares infectés par une acanthelle, comme les gammares non-infectés, renforcent encore leurs défenses anti-prédateurs. Cette utilisation accrue de refuges serait une des causes de la meilleure survie, face à la prédation, d'un hôte infecté par une acanthelle par rapport à un hôte non-infecté ; par conséquent, la survie de

l'acanthelle au sein de son hôte est également accrue. Une fois le stade infectieux atteint par le parasite (cystacanthé), une inversion de ce comportement s'opère chez les hôtes infectés : ceux-ci utilisent dorénavant moins les refuges que les hôtes non-infectés, en eau neutre comme en eau signée, augmentant la probabilité d'être prédatés par un hôte définitif, donc de poursuivre leur cycle de vie. Cette altération du comportement du gammare par un cystacanthé de *P. laevis* est désormais bien connue (Kaldonski et al. 2007), et s'intègre au sein d'autres manipulations comportementales observées chez les gammarés infectés par un cystacanthé de *P. laevis* (e.g. Cézilly et al. 2000, Kaldonski et al. 2007, Lagrue et al. 2007a, Franceschi et al. 2008). Chacune de ces manipulations comportementales de l'hôte est généralement considérée comme étant adaptative pour le parasite, celui-ci permettant d'accroître par ce biais ses chances de transmission vers l'hôte définitif (voir Lagrue et al. 2007a pour la démonstration du caractère adaptatif de la dérive des gammarés infectés). Toutefois, le lien direct entre la présence ou l'intensité d'une manipulation comportementale et l'augmentation des risques de prédation de l'hôte reste encore à démontrer (Cézilly et al. 2010), laissant en suspens de nombreuses questions – toujours débattues – concernant la valeur adaptative de chacune de ces manipulations et leurs origines potentiellement indépendantes ou syndromiques (voir respectivement Thomas et al. 2010 et Cézilly & Perrot-Minnot 2010). Dans notre étude, nous avons montré que l'utilisation de refuges est effectivement liée aux risques de prédation ; cependant, cette mesure comportementale des défenses anti-prédateur de l'hôte parasité intègre la réponse à plusieurs stimuli (phototaxie, thigmotaxie – dont le comportement d'agrégation – ou encore des stimuli olfactifs). Le lien direct entre chacune de ces taxies et les risques de prédation de l'hôte doit encore être déterminé.

La protection des hôtes infectés par une acanthelle de *P. laevis* pose de nombreuses questions tant évolutives qu'écologiques sur lesquelles nous reviendrons tout au long de cette discussion. Parker et al. (2009c) ont nommé cette protection de l'hôte par des stades parasitaires non-infectieux « suppression de la prédation », par opposition à l'« augmentation de la prédation » induite par les stades parasitaires infectieux et manipulateurs. D'après leur modèle, les stratégies de suppression de la prédation devraient avoir été plus souvent sélectionnées que celles d'augmentation de la prédation, grâce à des conditions d'évolution plus simples. De façon certaine, dès lors qu'un parasite n'est pas encore suffisamment développé pour poursuivre son cycle de vie, ses chances de survie dans l'hôte intermédiaire sont conditionnées aux stratégies de réduction des risques de mortalité de l'hôte, quels que soient ces risques. Une stratégie de réduction de ces risques de mortalité pourrait ainsi avoir

évolué chez de nombreux parasites, en particulier par la « protection » de l'hôte vis-à-vis de prédateurs ou d'autres parasites. Ceci a par exemple été décrit chez divers parasitoïdes (voir Maure et al. (sous presse) pour une synthèse détaillée). Les pressions de sélection antagonistes s'exerçant sur la virulence du parasite et la résistance de l'hôte seraient alors « relâchées » à certaines étapes du cycle de vie parasitaire. Les parasites à cycle complexe et à transmission trophique manipulant le comportement de leur hôte intermédiaire lorsqu'ils sont infectieux pour l'hôte suivant sont, de toute évidence, les premiers parasites chez lesquels l'investigation d'une stratégie de suppression de la prédation pourrait porter. En effet, si une stratégie favorisant la prédation de l'hôte intermédiaire, *a priori* coûteuse pour le parasite, a été sélectionnée, il est tout à fait concevable qu'une stratégie de protection de l'hôte ait évolué dans ce même système biologique (Parker et al. 2009c). Très récemment, une étude a montré que des copépodes (premiers hôtes intermédiaires) infectés par les stades non-infectieux du cestode *Schistocephalus solidus* ou du nématode *Camallanus lacustris*, sont significativement moins prédatés par l'épinoche *Gasterosteus aculeatus* (second hôte intermédiaire et hôte paraténique de ces deux parasites, respectivement) que les copépodes non-infectés (Weinreich et al. 2012). D'après les auteurs, cette diminution du risque de prédation est une stratégie adaptative des parasites, et résulterait, au moins pour *S. solidus*, de l'activité réduite des copépodes infectés par le stade non-infectieux du parasite montrée dans une étude précédente (Hammerschmidt et al. 2009). L'existence de changements comportementaux potentiellement induits par *C. lacustris* n'ont, eux, pas encore été recherchés. Il semble donc que *S. solidus* et *C. lacustris* aient vu l'évolution d'une stratégie de protection de leur hôte lorsqu'ils sont encore non-infectieux pour l'épinoche, à l'instar de ce que nous avons observé chez *P. laevis* infectant *G. pulex*.

Hypothèses évolutives de l'effet protecteur : une stratégie du parasite ?

Il est très tentant d'affirmer qu'un tel patron d'altération des comportements de l'hôte, i.e. protection puis manipulation, ne peut être qu'une adaptation du parasite, lui permettant d'exploiter son hôte de façon optimale à chaque phase de développement en accord avec ses propres « intérêts ». Dans un tel cas de figure, le critère du *purposive design* décrit par Poulin (1995), i.e. l'adéquation entre la manipulation comportementale de l'hôte et la complétion du cycle parasitaire, est respecté. Davantage d'études devront être menées dans d'autres systèmes hôte-parasite, afin de rendre compte de la potentielle ubiquité de la protection d'hôtes infectés par des stades parasitaires non-infectieux. Elles permettraient d'estimer le degré de

convergence évolutive, autre critère évoqué par Poulin (1995) comme étant un bon indicateur du potentiel adaptatif d'un trait. Jusqu'alors, les études d'Hammerschmidt et al. (2009), Weinreich et al. (2012) ainsi que la nôtre (chapitre 1) ont montré que trois espèces de parasites à transmission trophique très éloignées phylogénétiquement (un plathelminthe, un némathelminthe et un acanthocéphale, respectivement) présentent les mêmes patrons de changements comportementaux de leur hôte intermédiaire, à un moment précis de leur cycle de vie, permettant chez les hôtes infectés une diminution significative du risque d'être prédaté, comparé aux hôtes non-infectés. Cette convergence évolutive suggère que l'hypothèse du caractère adaptatif, pour le parasite, d'une telle stratégie de « protection puis manipulation » est plausible.

Je voudrais apporter ici une précision concernant l'amplitude de la sélectivité de la prédation, exercée par les hôtes définitifs des parasites, envers les hôtes intermédiaires non-infectés dans notre étude (chapitre 1) et l'étude de Weinreich et al. (2012). Une critique régulièrement entendue sur la mise en évidence de ce phénomène fait état de l'efficacité moindre de la protection de l'hôte par les stades non-infectieux, par rapport à sa manipulation par les stades infectieux, sur les probabilités de prédation des hôtes infectés et non-infectés résultantes (voir notamment la discussion de l'étude de Weinreich et al. 2012). Il est vrai que la mesure des taux de prédation relatifs de proies saines et de proies parasitées indique une plus forte sélectivité des prédateurs envers les hôtes manipulés par un stade infectieux (par rapport aux hôtes sains), qu'envers les hôtes sains (par rapport aux hôtes protégés par un stade non-infectieux). Cette différence serait en fait la conséquence des changements comportementaux observés chez les deux types d'hôtes infectés ; dans le cas de la favorisation de prédation, les proies offertes à la consommation sont soit infectées et manipulées, donc montrant des comportements aberrants (e.g. sortie hors d'un refuge, attirance par une odeur de prédateur), soit non-infectées et montrant alors des comportements anti-prédateurs forts (e.g. activité réduite, utilisation forte de refuges). La différence comportementale entre les deux types de proies est donc conséquente. A l'inverse, dans le cas de la protection, les proies offertes au prédateur montrent toutes des comportements anti-prédateurs, mais renforcés chez les proies infectées comparées aux proies non-infectées. Dans ce cas, le prédateur a alors le choix entre des proies le fuyant fortement, et d'autres le fuyant encore plus fortement. Le nombre de proies totales (infectées comme non-infectées) consommées dans ce type d'expérience est donc très faible. Au vu de l'évolution des indices de sélectivité en fonction du nombre de proies restant à la fin des expériences (voir la simulation présentée en annexe 1), les indices atteints lors des expériences de prédation

confrontant des proies protégées par leur parasite à des proies saines peuvent difficilement atteindre ceux obtenus lors d'expériences offrant des proies manipulées et des proies saines à la consommation par le prédateur. Par conséquent, cela ne devrait, à mon sens, ne présumer en rien de l'avantage apporté par une telle protection sur la survie des hôtes infectés, donc de leurs parasites.

Cependant, avant de conclure fermement quant au caractère adaptatif, pour le parasite, de tels changements comportementaux de son hôte (protection puis facilitation), il est nécessaire d'évaluer la balance entre les bénéfices reçus et les coûts qu'ils pourraient induire pour le parasite. Si l'avantage procuré au parasite par cette altération comportementale semble évident en termes de probabilité de survie puis de transmission, la complexité de la balance coûts/bénéfices en résultant demande que davantage d'études s'y intéressent. S'il est souvent admis que l'altération du comportement de l'hôte est coûteuse pour le parasite (Poulin et al. 2005, Thomas et al. 2005), de tels coûts n'ont pas encore été formellement démontrés, du moins pour ce qui est de la manipulation comportementale de l'hôte favorisant la transmission du parasite vers l'hôte suivant. La protection de l'hôte par le parasite peut s'accompagner de coûts pour celui-ci si, par exemple, sa croissance est réduite de telle façon que sa fécondité future sera négativement impactée. Maure et al. (2011) ont par exemple montré que la longueur de la phase de protection de l'hôte qu'induit un parasitoïde est négativement corrélée à la fécondité de ce dernier. Les ressources limitées de l'hôte auxquelles doit faire face le parasitoïde seraient la cause de ce compromis, puisque le parasite doit optimiser de manière conjointe sa propre croissance, positivement corrélée à sa future fécondité, et la survie de l'hôte (conditionnée à ses réserves énergétiques), lui assurant une meilleure survie jusqu'à l'émergence de l'adulte (Maure et al. 2011). Dans le cas de l'acanthelle de *P. laevis* protégeant son hôte contre les risques de prédation, le même compromis, pour le parasite, entre maximisation de sa croissance et maintien des conditions physiologiques de l'hôte pourrait être révélé par de futures études. Il se pourrait alors que les bénéfices en termes de survie accrue apportés par la protection de l'hôte soient surpassés par des coûts en termes de croissance et/ou de fécondité réduite. Alternativement à l'interprétation adaptative d'une stratégie « protection puis facilitation », d'autres hypothèses quant à l'origine de ce changement de comportement pourraient être testées, notamment celle d'une réponse compensatoire de l'hôte vis-à-vis de l'infection (voir des synthèses dans Agnew et al. 2000, Hurd 2001).

2. L'hôte subit-il des coûts à être protégé par son parasite ?

L'originalité d'une telle altération de comportement réside dans le partage apparent des bénéfices entre hôte et parasite. Dans le cas de l'infection d'un gammare par une acanthelle de *P. laevis*, l'acanthelle comme le gammare infecté semblent profiter d'une meilleure survie. Restait à définir si l'hôte intermédiaire subissait des coûts potentiellement associés à l'infection par une acanthelle. En ce qui concerne l'approvisionnement, la quantité de nourriture ingérée et l'état des réserves énergétiques des gammarés infectés, nous avons pu mesurer (i) les coûts liés aux changements comportementaux (c'est-à-dire ceux liés au manque d'exploration du milieu) et (ii) les coûts directement liés à l'infection, donc indépendants des changements comportementaux (en permettant à l'hôte de se nourrir sans explorer son milieu).

Quels coûts pour l'hôte ? Prise alimentaire et réserves énergétiques

Dans le chapitre 2, je me suis intéressée aux coûts que pouvait subir un gammare infecté par une acanthelle de *P. laevis*. Plus particulièrement, je me suis concentrée sur les coûts liés à l'utilisation de refuges sur le comportement d'approvisionnement et la prise alimentaire des gammarés infectés, par rapport aux hôtes sains. L'objectif premier était de rechercher un éventuel décalage de l'optimum comportemental de l'hôte entre ses défenses anti-prédateurs et son approvisionnement. D'après les résultats obtenus (article 2), les gammarés non-infectés montrent une prise alimentaire contexte-dépendante ; ceux-ci se nourrissent davantage en présence qu'en absence d'indices de prédateur, et augmentent la prise alimentaire lorsque la nourriture est présente dans le refuge. A l'inverse, leurs congénères infectés par une acanthelle, quel que soit le contexte extérieur (présence de nourriture dans ou hors du refuge, indices de prédateur ou non dans l'eau), s'approvisionnent toujours dans les mêmes quantités et à un niveau plutôt inférieur aux gammarés non-infectés. L'intensité d'utilisation des refuges ne semble pas être la seule variable expliquant la différence observée dans la prise alimentaire entre gammarés non-infectés et gammarés infectés par une acanthelle : l'infection elle-même, en dehors du renforcement des défenses anti-prédateur, paraît influencer fortement sur la prise alimentaire des gammarés. En toute logique, les réserves énergétiques des hôtes infectés devraient être affectées devant cette réduction de prise alimentaire, sans compter la présence de l'acanthelle qui, en grandissant, demande d'importantes quantités de ressources à son hôte. Notre résultat, décrivant des réserves énergétiques des gammarés infectés identiques à celles

des gammares non-infectés, est donc surprenant. La meilleure explication, me semble-t-il, implique une importante inactivité générale (activité moindre et plus forte utilisation des refuges) chez les gammares infectés par une acanthelle, contrairement aux gammares non-infectés. La physiologie des *G. pulex* infectés basculerait alors en mode « économie d'énergie » (i.e. potentiellement en hypométabolisme), permettant de compenser le détournement d'énergie par l'acanthelle pour sa croissance, le résultat étant un bilan énergétique balancé.

Les hôtes ne semblent donc pas subir de réels coûts liés à leur incapacité à ajuster leur consommation de nourriture, tout au moins sur leur quantité de réserves énergétiques. Etant donné que l'hôte conserve de bonnes réserves énergétiques, les coûts liés aux ressources limitées de l'hôte sont probablement également réduits pour le parasite.

Quels coûts pour l'hôte ? Motivation à la reproduction

Le comportement reproducteur des gammares infectés par une acanthelle est également une variable à prendre en compte, permettant d'évaluer la présence de coûts pour l'hôte infecté. D'après nos résultats (article 3), les gammares mâles infectés par une acanthelle sont tout aussi enclins à initier un gardiennage précopulatoire que les gammares mâles non-infectés. On sait que cette mise en pré-copula est un comportement énergétiquement coûteux pour les gammares mâles (Plaistow et al. 2003). Par ailleurs, des données recueillies en marge de cette expérience ont montré qu'en situation de compétition entre un mâle non-infecté et un mâle infecté par une acanthelle pour l'accès à une femelle, les deux mâles présentent la même probabilité de mise en couple (ce résultat demandant néanmoins à être confirmé avec un effectif plus large). Les hôtes mâles infectés par une acanthelle ne semblent donc pas subir de coûts liés à l'infection sur leur comportement reproducteur. L'ensemble des données recueillies sur le comportement des hôtes infectés par une acanthelle de *P. laevis* est détaillé dans le tableau 2, par comparaison au comportement des hôtes infectés par un cystacanthé.

A l'instar de ce qui a été observé dans d'autres systèmes hôtes-parasites (e.g. McCurdy et al. 2000, voir une synthèse dans Agnew et al. 2000), nous aurions également pu nous attendre à observer une augmentation de l'effort reproducteur des mâles, leur permettant d'augmenter leur aptitude phénotypique pendant la phase « latente » de l'infection, avant de subir la « castration partielle » lorsqu'infectés par un cystacanthé (Bollache et al. 2001). Cependant, nous avons mesuré la motivation des hôtes à se mettre en couple au moment où l'acanthelle était plutôt en fin de développement. Une augmentation de cette motivation

pourrait potentiellement n'être observée que lors des premières phases de développement du parasite suivant l'infection, de manière similaire à ce qui a pu être observé chez un parasite trématode et son hôte amphipode (mâle) (McCurdy et al. 2000). De nouvelles études devront donc analyser le comportement reproducteur des mâles infectés par une acanthelle tout au long du développement du parasite, de façon à rendre compte de l'effort reproducteur des hôtes en fonction de l'âge de l'acanthelle. De la même manière, il serait intéressant d'évaluer des variables physiologiques des mâles infectés, comme la qualité de leurs spermatozoïdes ou la régularité de leur cycle de mue, qui pourraient avoir un effet sur le nombre d'œufs fécondés et le nombre de femelles prises en amplexus, respectivement (voir l'article 3). Enfin, il est intéressant de noter que ce que nous avons mesuré dans l'article 3 est la capacité des mâles à se mettre en couple à un moment donné (ici, au stade acanthelle « âgée », i.e. quelques jours avant le passage au stade cystacanthé infectieux), c'est-à-dire l'effet direct de l'infection par une acanthelle sur la motivation des mâles à se mettre en couple. En clair, nous savons qu'un mâle infecté par une acanthelle est en mesure de s'accoupler avec une femelle si celle-ci se trouve disponible pour celui-ci. L'effet de la protection des mâles par les acanthelles sur leur probabilité d'appariement reste à déterminer, en complexifiant l'environnement des mâles (intégration de refuges). L'accroissement des réponses anti-prédateur (*via* l'utilisation de refuges) pourrait diminuer significativement la capacité des mâles à aller explorer l'environnement à la recherche d'une femelle réceptive à la copulation. Le résultat de notre expérience sur la recherche de nourriture suggère que l'exploration est effectivement affectée, mais nous ne sommes pas en mesure de dire si ce phénomène est général ou spécifique à l'approvisionnement en nourriture. Une expérience spécifiquement dédiée à la recherche d'un partenaire reproducteur pourrait affiner l'évaluation de ces coûts pour les hôtes, potentiellement associés à la protection par l'acanthelle.

L'infection par une acanthelle de *P. laevis* pourrait donc engendrer des effets significatifs sur les traits d'histoire de vie reproductifs des hôtes. Ceci demande cependant à être complété en étudiant l'effet de l'acanthelle sur les femelles *G. pulex*, notamment leur fécondité. S'il est connu que le cystacanthé de *P. laevis* castré partiellement ses hôtes femelles en diminuant leur fécondité (Bollache et al. 2002), la capacité des femelles infectées par une acanthelle à maintenir leur fécondité, voire à l'augmenter, reste à établir. De telles expériences ne sont cependant pas évidentes à mettre en place, étant donné le caractère très contraint du décours temporel de la reproduction des amphipodes femelles.

Tableau 2. Effets de l’acanthelle et du cystacanthé de *P. laevis* sur différentes composantes comportementales et physiologiques de leur hôte intermédiaire *G. pulex*, par rapport aux *G. pulex* non-infectés. Les signes – et + indiquent le sens des différences entre les hôtes infectés et les hôtes sains, le signe = désigne une absence de différence significative entre hôtes infectés et sains, et le signe ? fait référence à une variable à étudier.

	Effet de l’acanthelle	Effet du cystacanthé
Phototactisme	=	+ (article 4)
Activité générale	–	= (tendance vers +, article 2)
Utilisation de refuges	+	– (article 1)
Prise alimentaire	– (indépendante du contexte)	= (article 2) – (Brown & Pascoe 1989)
Réserves énergétiques	=	– (lipides et glycogène, article 2) + (glycogène, Plaistow et al. 2001)
Reproduction	= (mâles) ? (femelles)	– (mâles) (article 3) – (femelles) (Bollache et al. 2002)

Origine de la protection de l’hôte infecté : induction par le parasite ou stratégie mixte ?

Si l’acanthelle est bien à l’origine des altérations comportementales observées chez l’hôte infecté, deux options s’offrent à nous quant à la nature de ces changements comportementaux.

La première possibilité est que l’acanthelle protège son hôte *stricto sensu*, de façon analogue à la manipulation de l’hôte *stricto sensu* exercée par le cystacanthé quelques semaines plus tard (voir Thomas et al. 2012). Ceci suppose que l’acanthelle est la seule gagnante du conflit, donc que l’hôte subit des coûts liés à la protection induite par le parasite. De tels coûts n’ont pas été clairement mis en évidence en termes de coûts physiologiques ni en termes de réduction de l’effort reproductif (voir la discussion s’y rapportant ci-dessus). Dans le cas d’une « protection *stricto sensu* », l’acanthelle devrait aussi être fonctionnellement à l’origine de l’altération comportementale de son hôte. En résumé, le parasite devrait produire un composé libéré dans la cavité générale de son hôte, composé ayant un effet au niveau du système nerveux central. Dans les manipulations conduisant à la favorisation de prédation, divers mécanismes ont été proposés (voir Adamo (2012), Helluy (sous presse) et Perrot-Minnot & Cézilly (sous presse) pour des synthèses). Par exemple, la sérotonine (à la fois sa synthèse et son accumulation neuronale) est impliquée et positivement

corrélée à l'intensité de la photophilie des gammares infectés par un cystacanthe de *P. laevis* (Tain et al. 2006). Si c'est uniquement la phototaxie qui est liée aux changements de l'activité sérotonergique, nous pouvons nous attendre à ne rien observer de ce côté chez les gammares infectés par une acanthelle, ceux-ci étant aussi photophobes que les gammares non-infectés (Franceschi et al. 2008). Davantage d'études sont à réaliser sur l'activité sérotonergique du cerveau des gammares infectés, notamment ceux infectés par une acanthelle de *P. laevis*, ceci n'ayant encore jamais été étudié. Au-delà de la sérotonine, d'autres mécanismes peuvent être à l'origine des changements comportementaux des gammares infectés. Ces mécanismes sont peut-être à rechercher à l'interface entre immunité et fonctions neuronales de l'hôte, comme le suggère Adamo (2012). Cette discussion nous amène directement à la seconde option que je voudrais maintenant aborder concernant la nature de la protection de l'hôte comme stratégie parasitaire.

Les bénéfices *a priori* partagés entre gammare et acanthelle pendant l'infection (au moins en termes de survie accrue), d'une part, et l'absence de coûts non compensables pour l'hôte, d'autre part, semblent aller dans le sens d'une stratégie d'exploitation, par l'acanthelle, des ressources compensatoires de l'hôte (Lefèvre et al. 2008, 2009). Ceci implique que l'acanthelle ne soit plus la seule gagnante du conflit qui l'oppose à son hôte, mais plutôt que l'issue du conflit se caractérise par un « règlement négocié » entre les deux parties (Wellnitz 2005). Brièvement, l'infection par une acanthelle agissant sur certains traits d'histoire de vie de l'hôte, ce dernier devrait avoir été sélectionné pour compenser les effets néfastes de l'infection *via* la modification de traits directement liés à son aptitude phénotypique actuelle ou future. Par exemple, si l'infection par un parasite réduit les probabilités de survie de son hôte, les hôtes infectés capables d'investir les ressources préalablement dédiées à leur reproduction dans leur survie seraient avantagés, notamment s'ils survivent à l'infection et compensent plus tard la perte de fécondité occasionnée par l'infection (voir des synthèses dans Agnew et al. 2000 et Hurd 2001). En agissant de la sorte, un hôte infecté présente, certes, une aptitude phénotypique moindre que celle des individus non-infectés, mais supérieure à celle des individus infectés ne compensant pas les effets délétères du parasitisme. Potentiellement, de telles réponses compensatoires de l'hôte pourraient être également bénéfiques au parasite, et ainsi conduire à la sélection des parasites capables d'exploiter ces réponses compensatoires (Lefèvre et al. 2008, 2009).

Dans le cas de l'acanthelle de *P. laevis*, une stratégie d'exploitation des ressources compensatoires du gammare par l'acanthelle aurait le mérite d'expliquer les conséquences favorables à la fois pour *P. laevis* et pour le gammare de l'altération du comportement de ce

dernier. Deux voies sont à envisager dans la mise en place d'une telle stratégie : soit l'infection par *P. laevis* est la cause directe des réponses compensatoires du gammare (de par son effet néfaste sur l'aptitude phénotypique de l'hôte), soit l'acanthelle déclenche la réponse compensatoire de son hôte indirectement en mimant les causes induisant cette réponse (réponse qui aurait donc été sélectionnée dans d'autres contextes écologiques, Lefèvre et al. 2009, Thomas et al. 2012). Je propose ci-dessous deux hypothèses permettant d'expliquer chacune de ces possibilités.

Tout d'abord, l'acanthelle peut potentiellement être directement à l'origine des réponses compensatoires observées chez l'hôte. Un tel phénomène ne peut être induit que par une réponse spécifique au parasitisme. La réponse immunitaire de l'hôte est, par définition, une réponse spécifique au phénomène de parasitisme. Or, il a été montré chez les hôtes vertébrés que l'activité immunitaire peut influencer leurs fonctions neuronales, de par la production de cytokines (dans l'association *Toxoplasma gondii*-rongeur, voir Webster & McConkey 2010, cité par Adamo 2012). Les cytokines libérées dans le cerveau des vertébrés après une infection sont, en effet, à l'origine du syndrome de « maladie comportementale » (ou *behavioural sickness*) semblant être bénéfique pour l'hôte (voir Dantzer & Kelley 2007). Ce syndrome est également retrouvé chez les invertébrés (notamment les insectes, Adamo 2006), avec des mécanismes probablement assez proches que ceux rencontrés chez les vertébrés. Un tel syndrome est intéressant dans notre cas, puisqu'il comprend des changements comportementaux chez l'hôte infecté tels que l'anorexie et la fatigue, symptômes que l'on retrouve justement chez un gammare parasité par une acanthelle de *P. laevis*. De plus, ce syndrome engendrerait des comportements « anxieux » chez les hôtes parasités, renforçant potentiellement les défenses anti-prédateurs (Thompson & Kavaliers 1994). Cependant, alors que l'on sait que le système immunitaire de *G. pulex* parasité par un cystacanthe de *P. laevis* est largement déprimé (e.g. Rigaud et Moret 2003, Cornet et al. 2009), la réponse immunitaire des hôtes infectés par une acanthelle n'a pas encore été recherchée. Il en existe toutefois quelques indices, selon lesquels l'infection précoce d'hôtes intermédiaires par des parasites acanthocéphales induit une réponse immunitaire chez l'hôte. En effet, lors du passage de la paroi intestinale de l'hôte intermédiaire par l'acanthor, d'importants phénomènes de production de phénoloxidase (PO) et de regroupement d'hémocytes autour de l'endroit de pénétration ont été observés chez des insectes (dictyoptères) et des crustacés (isopodes) (Taraschewski 2000). Cependant, lors de la croissance ultérieure du parasite, donc lors des stades acanthelles « jeunes » et « tardives », ces phénomènes ne sont plus observés (Taraschewski 2000), ce qui tendrait à suggérer que la

réponse immunitaire n'est plus aussi forte. Est-elle déjà déprimée à ce stade ? La question reste ouverte à ce jour. Dans notre cas particulier, mais également d'une manière générale, les études recherchant l'origine mécanistique des changements comportementaux chez les hôtes parasités plaident ainsi pour une meilleure intégration des systèmes nerveux, endocriniens et immunitaires, ceux-ci n'agissant pas de manière indépendante sur le comportement des individus (Demas et al. 2011, Helluy (sous presse), Perrot-Minot & Cézilly (sous presse)).

D'autre part, et de façon plus indirecte, l'acanthelle de *P. laevis* pourraient potentiellement mimer des conditions stressantes dans lesquelles les gammares présenteraient une forme d'anorexie. Diverses situations environnementales défavorables, telles que la pollution par des métaux lourds, induisent notamment une diminution de la prise alimentaire de crustacés amphipodes (voir un exemple avec la pollution au Cadmium dans McCahon et al. 1988, Brown & Pascoe 1989). La réponse compensatoire du gammare face à cette anorexie pourrait être une diminution de son activité générale, lui permettant d'économiser ses réserves et donc d'accroître sa survie. Le comportement anti-prédateur accru ne serait alors qu'une conséquence de cette réduction d'activité, les gammares préférant sans doute être à l'abri lors de ces phases d'inactivité, plutôt qu'exposés. Cette hypothèse pourrait être testée en imposant le jeûne à des gammares sains, en les privant de nourriture à des intensités et sur des durées variables, ou en leur fournissant des aliments de qualité nutritionnelle variable, puis en mesurant leur activité, leur utilisation de refuges et, *in fine*, leurs réserves énergétiques. Si des gammares non-infectés répondent ainsi à la privation de nourriture, l'hypothèse de l'exploitation des ressources compensatoires de l'hôte par l'acanthelle de *P. laevis* serait alors privilégiée. Alternativement, imposer d'autres stress que la privation de nourriture (stress de pollution, stress de température) permettrait de tester la généralité de ces réponses.

3. Conflit acanthelle-cystacanthé : une explication à l'intensité variable de la manipulation comportementale des hôtes infectés

Si l'acanthelle est capable d'induire une protection de son hôte intermédiaire, ou d'exploiter les réponses compensatoires de son hôte suite à l'infection, alors que le cystacanthé accroît ses chances de transmission à l'hôte définitif en manipulant ce même hôte intermédiaire, la co-infection d'un gammare par une acanthelle et un cystacanthé de *P. laevis* devrait mener à un conflit entre les deux sur l'exploitation de l'hôte.

D'après les résultats de notre étude (chapitre 3, article 4), les gammares infectés séquentiellement, donc infectés à un moment donné par une acanthelle et un cystacanthé de *P.*

laevis, présentent un comportement plus photophile que celui des hôtes non-infectés et infectés par des acanthelles. Cependant, ils présentent également un comportement moins photophile que celui des hôtes infectés par des cystacanthes. De plus, la photophilie de ces hôtes infectés par cystacanthé et acanthelle n'augmente pas dans le temps (notamment, elle n'est pas augmentée lorsque l'acanthelle devient cystacanthé à son tour), contrairement aux hôtes infectés par un cystacanthé dont la manipulation comportementale s'accroît avec le temps. L'ensemble de ces résultats indique que dans le conflit entre cystacanthé et acanthelle, aucun des deux protagonistes ne semble prendre l'avantage. En effet, dû à la photophilie significative de son hôte, l'acanthelle risque de payer des coûts en termes de probabilité de prédation augmentée du gammare qu'elle infecte. Le cystacanthé, lui, s'expose à des probabilités de transmission potentiellement réduites, dues à la manipulation de son hôte d'intensité moindre dans ces conditions que s'il était seul à infecter le gammare. Ceci implique, cependant, que (i) la photophilie des gammares soit effectivement un comportement important permettant d'accroître à lui seul les probabilités de prédation du gammare par un hôte définitif, donc la transmission du parasite, et (ii) dans le contexte décrit par le point précédent, l'intensité de la photophilie soit positivement corrélée aux risques de prédation du gammare (voir Cézilly et al. 2010). Peu d'études font effectivement état du caractère adaptatif d'une manipulation comportementale d'un hôte infecté ; récemment, une étude a même montré que la diminution de la photophobie induite par un parasite acanthocéphale sur son hôte gammaridé n'explique pas, à elle seule, l'augmentation des risques de prédation des hôtes parasités (Perrot-Minnot et al. 2012). Cependant, la photophilie étant un comportement perturbé par l'infection, il n'en reste pas moins que cette perturbation n'est pas d'une intensité équivalente lorsque les parasites aux différents stades de leur développement sont soit seuls à infecter leur hôte soit accompagnés d'un congénère d'un stade différent.

Si les conséquences du conflit acanthelle-cystacanthé (i.e. la photophilie intermédiaire » des gammares bi-infectés) sur les probabilités de prédation de l'hôte intermédiaire demande davantage d'études, ce conflit révèle probablement des mécanismes opposés, mais ne s'excluant pas mutuellement, quant à l'induction de l'altération comportementale propre à chaque stade parasitaire en co-infection, produisant ce fameux phénotype « moyennement manipulé ». L'hypothèse d'une protection de l'hôte induite par l'acanthelle, *via* l'exploitation de ses réponses compensatoires, pourrait être confirmée par l'issue de ce conflit, acanthelle et cystacanthé ayant des stratégies suffisamment différentes d'un point de vue mécanistique pour que l'une n'annule pas l'autre. Une stratégie de sabotage de la manipulation induite par le cystacanthé n'a donc pas évolué chez l'acanthelle de *P.*

laevis, pourtant connue dans d'autres systèmes hôte-parasite (e.g. Haine et al. 2005). Une telle stratégie doit probablement être coûteuse à développer, et pourrait, chez l'acanthelle, venir perturber la mise en place de sa stratégie de protection de l'hôte. Du fait de ces coûts de production, il semble effectivement peu probable pour une acanthelle d'être en mesure d'agir sur le comportement de l'hôte *via* deux mécanismes différents en même temps (l'un destiné à la protection de l'hôte, l'autre au sabotage), tout comme d'être capable de détecter la présence d'un conspécifique plus âgé, lui permettant de « choisir » la bonne altération à mettre en place (protection ou sabotage). Il est alors concevable que le sabotage complet, par un parasite, de la manipulation exercée par un autre parasite ne soit rencontré que dans des systèmes hôte-parasite où le saboteur potentiel n'aurait pas à mettre en place sa propre altération comportementale. Enfin, de manière évidente, les pressions de sélection doivent être suffisamment fortes dans la population de parasites pour voir l'évolution d'une telle stratégie de sabotage, ce qui passe notamment par des risques de co-infections importants (voir Lafferty et al. 2000). Probablement pour les mêmes raisons, aucune stratégie d'exclusion d'un second parasite n'a été sélectionnée chez *P. laevis* ; un résultat similaire a été observé par Outreman et al. (2002) dans l'étude du potentiel conflit interspécifique, chez *G. pulex*, entre *P. laevis* et *Polymorphus minutus*, un acanthocéphale d'oiseau aquatique.

Cette étude fournit de nouvelles raisons de se pencher sur le système immunitaire des hôtes amphipodes infectés par une acanthelle de *P. laevis*. En effet, nous avons montré que les œufs de *P. laevis* ont la même probabilité d'infecter et de s'établir durablement dans un gammaré déjà infecté par une très jeune acanthelle que dans un gammaré sain. Ceci implique que l'immunosuppression de l'hôte induite par un cystacanthe de *P. laevis* (e.g. Rigaud & Moret 2003) n'est peut-être pas effective au stade acanthelle. L'autre possibilité implique que, s'il y a une immunosuppression du système PO au stade acanthelle, celle-ci ne permet pas la sur-infection de l'hôte par d'autres acanthocéphales ; à l'opposé, Cornet et al. (2009) ont montré que les risques de sur-infection bactérienne sont plus forts chez les gammarés infectés par un cystacanthe de *P. laevis* que chez les gammarés sains.

Les conflits entre deux espèces de parasites, ou comme ici entre deux conspécifiques différant dans leur stade de développement, sont une source potentiellement importante de la variation fréquemment observée dans l'intensité de la manipulation comportementale des hôtes intermédiaires (Thomas et al. 2011, Thomas et al. 2012). Ces conflits, induits par l'âge du parasite, demandent par conséquent plus d'attention lors de l'investigation des causes de la variation de la manipulation comportementale.

4. Remarque de conclusion : perspectives écologiques

J'aimerais terminer cette discussion en abordant des considérations plus écologiques, qui n'ont que peu été abordées jusqu'alors. Comme l'explique Thomas et al. (2012), « pour comprendre l'évolution de la manipulation de l'hôte par les parasites, il faut considérer les hôtes manipulés dans leur contexte écologique, puisque seule cette approche permet une véritable évaluation des pressions de sélection subies à la fois par les hôtes et les parasites ».

En amont de l'évolution de la manipulation, la meilleure stratégie d'exploitation de l'hôte doit, en effet, correspondre aux exigences écologiques rencontrées dans le milieu naturel. Thomas et al. (2012) illustre ceci par le fait que la manipulation comportementale de l'hôte peut varier au sein d'une même espèce de parasite, si les contextes environnementaux rencontrés par chaque population de parasites diffèrent. Les conditions biotiques de l'environnement font, par exemple, référence à la gamme d'hôtes définitifs que comprend chaque environnement, dans laquelle évolue chaque population de parasites manipulateurs. Selon le type d'hôte utilisé et ses caractéristiques écologiques, la manipulation peut varier, menant potentiellement à une forte différenciation génétique entre des populations de parasites utilisant différents hôtes, un phénomène couramment appelé émergence de « races d'hôte » (voir Steinauer et al. (2007) pour la seule étude, à ma connaissance, révélant l'existence d'une différenciation génétique, à large échelle géographique, entre des parasites acanthocéphales conspécifiques utilisant des hôtes définitifs différents). D'autre part, à l'échelle biotique comme abiotique, il semble important de prendre en compte les différents types de microhabitats rencontrés dans chaque environnement ; en effet, un changement comportemental (parmi l'ensemble des manipulations observées dans un contexte multidimensionnel) adaptatif dans un habitat peut être neutre vis-à-vis de la sélection dans un autre habitat (Cézilly et al. 2010). Dans un tel contexte métapopulationnel, le caractère adaptatif d'un changement comportemental peut fortement varier d'une population de parasite à l'autre. L'importance de la protection induite par le parasite non-infectieux dans ce cadre écologique, comme de la manipulation induite par le stade infectieux, reste totalement inexplorée, et mérite davantage d'attention dans de futures études. Par ailleurs, les conditions d'évolution d'une stratégie protectrice sont étroitement liées aux risques de prédation rencontrés *in natura* (lui-même dépendant de la densité de prédateurs ou encore de la densité et de la diversité des proies). Un modèle mathématique pourrait permettre de mieux formaliser et prédire certains paramètres critiques, tels que la pression de prédation (voir le

modèle de Seppälä & Jokela (2008) évaluant l'importance du risque de prédation initial, i.e. celui des hôtes non-infectés, dans l'évolution de la manipulation parasitaire).

Plus en aval, cette fois-ci, les changements comportementaux des hôtes infectés ont d'importantes conséquences sur l'écologie des communautés. Au sein d'une communauté écologique, les relations prédateurs-proies, notamment, sont certainement fortement influencées par la présence d'un parasite manipulateur. En effet, celui-ci accroît la disponibilité des proies infectées *via* la favorisation de prédation qu'il induit, modifiant les patrons originaux des interactions entre espèces au sein de la communauté. Basée sur un modèle théorique, l'étude de Fenton & Rands (2006) montre que les manipulations comportementales des hôtes infectés peuvent fortement altérer les dynamiques des communautés prédateurs-proies. Il serait très intéressant d'intégrer la protection de l'hôte induite par un parasite non-infectieux au sein d'un tel modèle, afin d'entrevoir son effet sur les communautés d'hôtes. La protection annulerait-elle les effets de la manipulation comportementale, exercée par les parasites infectieux, sur les interactions interspécifiques ? Une fois encore, à l'échelle écologique cette fois, cette thèse aura plaidé pour l'intégration du cycle parasitaire complet dans les études d'impact, quel qu'il soit, de la manipulation parasitaire.

*« I am thankful that this history has no real conclusion, at least not in the sense of 'ending' »
(Janice Moore, 2012).*

Bibliographie

Bibliographie

Adamo, S.A. 2006. Comparative psychoneuroimmunology: evidence from the insects. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* **5**: 128-140.

Adamo, S.A. 2012. The strings of the puppet master: how parasites change host behaviour. In: *Host manipulation by parasites* (D.P. Hughes, J. Brodeur & F. Thomas, eds), pp. 36-51. Oxford University Press, Oxford.

Agnew, P., Koella, J.C. & Michalakis, Y. 2000. Host life history responses to parasitism. *Microbes Inf.* **2**: 891-896.

Amin, O.M. 1985. Classification. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 27-72. Cambridge University Press, New-York.

Anderson, R.A., Koella, J.C. & Hurd, H. 1999. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. B* **266**: 1729-1733.

Bakker, T.C.M., Mazzi, D. & Zala, S. 1997. Parasite-induced changes in behavior and color make *Gammarus pulex* more prone to fish predation. *Ecology* **78**: 1098-1104.

Ball, M.A., Parker, G.A. & Chubb, J.C. 2008. The evolution of complex life cycles when parasitic mortality is size- or time-dependant. *J. Theor. Biol.* **253**: 202-214.

Barger, M.A. & Nickol, B.B. 1999. Effects on coinfection with *Pomphorhynchus bulbocolli* on development of *Leptorhynchoides thecatus* (Acanthocephala) in amphipods (*Hyaella azteca*). *J. Parasitol.* **85**: 60-63.

Bauer, A., Trouvé, S., Grégoire, A., Bollache, L. & Cézilly, F. 2000. Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1453-1457.

- Bethel, W.M. & Holmes, J.C. 1974. Correlation of development of altered evasive behavior in *Gammarus lacustris* (Amphipoda) harboring cystacanths of *Polymorphus paradoxus* (Acanthocephala) with infectivity to the definitive host. *J. Parasitol.* **60**: 272-274.
- Bollache, L., Gambade, G. & Cézilly, F. 2001. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **49**: 296-303.
- Bollache, L., Rigaud, T. & Cézilly, F. 2002. Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *J. Inv. Pathol.* **79**: 102-110.
- Brown, A.F. & Pascoe, D. 1989. Parasitism and host sensitivity to cadmium – an acanthocephalan infection of the fresh-water amphipod *Gammarus pulex*. *J. Appl. Ecol.* **26**: 473-487.
- Brown, S.P., De Lorgeril, J., Joly, C. & Thomas, F. 2003. Field evidence for density-dependent effects in the trematode *Microphallus papillorobustus* in its manipulated host, *Gammarus insensibilis*. *J. Parasitol.* **89**: 668-672.
- Buckling, A. & Brockhurst, M.A. 2008. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* **100**: 484–488.
- Cézilly, F., Grégoire, A. & Bertin, A. 2000. Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study on the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology* **120**: 625-630.
- Cézilly, F. & Perrot-Minnot, M.-J. 2010. Interpreting multidimensionality in parasite-induced phenotypic alterations: panselectionism versus parsimony. *Oikos* **119**: 1224-1229.
- Cézilly, F., Thomas, F., Médoc, V. & Perrot-Minnot, M.-J. 2010. Host-manipulation by parasites with complex life cycles: adaptive or not? *Trends Parasitol.* **26**: 311-317.

- Choisy, M., Brown, A.P., Lafferty, K.D. & Thomas, F. 2003. Evolution of trophic transmission in parasites: why add intermediate hosts? *Am. Nat.* **162**: 172-181.
- Chubb, J.C., Ball, M.A. & Parker, G.A. 2010. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends Parasitol.* **26**: 93-102.
- Combes, C. 2001. *Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Cornet, S., Franceschi, N., Bauer, A. Rigaud, T. & Moret, Y. 2009. Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **39**: 221-229.
- Crompton, D.W.T. 1985. Reproduction. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 213-272. Cambridge University Press, New-York.
- Dantzer, R. & Kelley, K.W. 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.* **21**: 153–160.
- Demas, G.E., Adamo, S.A. & French, S.S. 2011. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Funct. Ecol.* **25**: 29-39.
- Dezfuli, B.S., Giari, L. & Poulin, R. 2001. Costs of intraspecific and interspecific host sharing in acanthocephalan cystacanths. *Parasitology* **122**: 483-489.
- Dianne, L., Bollache, L., Lagrue, C., Franceschi, N. & Rigaud T. 2012. Larval size in acanthocephalan parasites: Influence of intraspecific competition and effects on intermediate host behavioural changes. *Parasit. Vectors* **5**: 166.
- Fenton, A. & Rands, S.A. 2006. The impact of parasite manipulation and predator foraging behavior on predator-prey communities. *Ecology* **87**: 2832-2841.

- Franceschi, N., Bauer, A., Bollache, L. & Rigaud, T. 2008. The effects of parasite age and intensity on variability in acanthocephalan-induced behavioural manipulation. *Int. J. Parasitol.* **38**: 1161-1170.
- Franceschi, N., Bollache, L., Cornet, S., Bauer, A., Motreuil, S. & Rigaud, T. 2010. Co-variation between the intensity of behavioural manipulation and parasite development time in an acanthocephalan–amphipod system. *J. Evol. Biol.* **23**: 2143-2150.
- Fredensborg, B.L. & Poulin, R. 2005. Larval helminths in intermediate hosts: does competition early in life determine the fitness of adult parasites? *Int. J. Parasitol.* **35**: 1061-1070.
- Galvani, A.P. 2003. Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 132-139.
- Garey, R.J., Nonnemacher, M.R., Near, T.J. & Nadler, S.A. 1996. Molecular evidence for acanthocephalans as a sub-taxon of rotifers. *J. Mol. Evol.* **43**: 45-54.
- Gower, C. & Webster, J. 2004. Fitness of indirectly transmitted pathogens: restraint and constraint. *Evolution* **58**: 1178–1184.
- Haine, E.R., Boucansaud, K. & Rigaud, T. 2005. Conflict between parasites with different transmission strategies infecting an amphipod host. *Proc. R. Soc. B* **272**: 2505-2510.
- Hammerschmidt, K., Koch, K., Milinski, M., Chubb, J.C. & Parker, G.A. 2009. When to go: optimization of host switching in parasites with complex life cycles. *Evolution* **63**: 1976-1986.
- Hammerschmidt, K. & Kurtz, J. 2005. Evolutionary implications of the adaptation to different immune systems in a parasite with a complex life cycle. *Proc. R. Soc. B* **272**: 2511-2518.
- Helluy, S. Parasite-induced alterations of sensorimotor pathways in gammarids: collateral damage of neuroinflammation? *J. Exp. Biol.* In press.

- Herre, E.A., Knowlton, N., Mueller, U.G. & Rehner, S.A. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* **14**: 49-53.
- Hurd, H. 2001. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trends Parasitol.* **17**: 363-368.
- Hurd, H. & Fogo, S. 1991. Changes induced by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) in the behaviour of the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera). *Can. J. Zool.* **69**: 2291-2294.
- Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. 2007. Differential influence of two acanthocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Anim. Behav.* **74**: 1311-1317.
- Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J., Motreuil, S. & Cézilly, F. 2008. Infection with acanthocephalans increases the vulnerability of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to non-host invertebrate predators. *Parasitology* **135**: 627-632.
- Kennedy, C.R. 1999. Post-cyclic transmission in *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Folia Parasitol.* **46**: 111-116.
- Kennedy, C.R. 2006. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, New-York.
- Kennedy, C.R., Broughton, P.F. & Hine, P.M. 1978. The status of brown and rainbow trout, *Salmo trutta* and *S. gairdneri* as hosts of the acanthocephalan, *Pomphorhynchus laevis*. *J. Fish Biol.* **13**: 265-275.
- Koella, J.C., Rieu, L. & Paul, R.E.L. 2002. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behav. Ecol.* **13**: 816-820.
- Lafferty, K.D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitol. Today* **15**: 111-115.

- Lafferty, K.D., Thomas, F. & Poulin, R. 2000. Evolution of host-phenotype manipulation by parasites and its consequences. In: *Evolutionary biology of host-parasite relationships: theory meets reality* (R. Poulin, S. Morand & A. Skorping, eds), pp. 117-127. Elsevier, Amsterdam.
- Lagrue, C., Kaldonski, N., Perrot-Minnot, M.-J., Motreuil, S. & Bollache, L. 2007a. Modification of hosts' behavior by a parasite: field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* **88**: 2839-2847.
- Lagrue, C., McEwan, J., Poulin, R. & Keeney, D.B. 2007b. Co-occurrences of parasite clones and altered host phenotype in a snail–trematode system. *Int. J. Parasitol.* **37**: 1459-1467.
- Lagrue, C. & Poulin, R. 2008. Intra- and interspecific competition among helminth parasites: Effects on *Coitocaecum parvum* life history strategy, size and fecundity. *Int. J. Parasitol.* **38**: 1435-1444.
- Lambrechts, L., Fellous, S. & Koella, J.C. 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* **22**: 12–16.
- Lazzaro, B.P. & Little, T.J. 2009. Immunity in a variable world. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**: 15-26.
- Lefèvre, T., Roche, B., Poulin, R., Hurd, H., Renaud, F. & Thomas, F. 2008. Exploiting host compensatory responses: the 'must' of manipulation? *Trends Parasitol.* **24**: 435-439.
- Lefèvre, T., Adamo, S., Biron, D.G., Missé, D., Hughes, D. & Thomas, F. 2009. Invasion of the body snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host–parasite interactions. *Adv. Parasitol.* **68**: 45-83.
- Levri, E.P. & Lively, C.M. 1996. The effects of size, reproductive condition and parasitism on foraging behaviour in a freshwater snail, *Potamopyrgus antipodarum*. *Anim. Behav.* **51**: 891-901.
- Maure, F., Brodeur, J., Ponlet, N., Doyon, J., Firlej, A., Elguero, E. & Thomas, F. 2011. The cost of a bodyguard. *Biol. Lett.* **7**: 843-846.

Maure, F., Payette Daoust, S., Brodeur, J., Mitta, G. & Thomas, F. Diversity and evolution of bodyguard manipulation. *J. Exp. Biol.* In press.

McCahon, C.P., Brown, A.F. & Pascoe, D. 1988. The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* (Muller 1776) on the acute toxicity of cadmium to its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex* (L). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**: 239-243.

McCahon, C.P., Maund, S.J. & Poulton, M.J. 1991. The effect of the acanthocephalan parasite (*Pomphorhynchus laevis*) on the drift of its intermediate host (*Gammarus pulex*). *Fresh. Biol.* **25**: 507-513.

McCarthy, H.O., Fitzpatrick, S. & Irwin, S.W.B. 2000. A transmissible trematode affects the direction and rhythm of movements in a marine gastropod. *Anim. Behav.* **59**: 1161-1166.

McCurdy, D.G., Forbes, M.R. & Boates, J.S. 2000. Male amphipods increase their mating effort before behavioural manipulation by trematodes. *Can. J. Zool.* **78**: 606-612.

Médoc, V., Rigaud, T., Motreuil, S., Perrot-Minnot, M.-J. & Bollache, L. 2011. Paratenic hosts as regular transmission route in the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*: potential implications for food webs. *Naturwissenschaften* **98**: 825-835.

Michalakis, Y., Olivieri, I., Renaud, F. & Raymond, M. 1992. Pleiotropic action of parasites: How to be good for the host? *Trends Ecol. Evol.* **7**: 59-62.

Monks, S. 2001. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Syst. Parasitol.* **48**: 81-116.

Moore, J. 1984. Altered behavioural response in intermediate hosts – an acanthocephalan parasite strategy. *Am. Nat.* **123**: 572-577.

Moore, J. 2002. *Parasites and the behavior of animals*. Oxford University Press, New-York.

Moore, J. 2012. A history of parasites and hosts, science and fashion. In: *Host manipulation by parasites* (D.P. Hughes, J. Brodeur & F. Thomas, eds), pp. 1-13. Oxford University Press, Oxford.

Near, T.J. 2002. Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism. *Integ. Comp. Biol.* **42**: 668-677.

Outreman, Y., Bollache, L., Plaistow, S. & Cézilly, C. 2002. Patterns of intermediate host use and levels of association between two conflicting manipulative parasites. *Int. J. Parasitol.* **32**: 15-20.

Parker, G.A., Ball, M.A. & Chubb, J.C. 2009a. To grow or not to grow? Intermediate and paratenic hosts as helminth life cycle strategies. *J. Theor. Biol.* **258**: 135-147.

Parker, G.A., Ball, M.A. & Chubb, J.C. 2009b. Why do larval helminths avoid the gut of intermediate hosts? *J. Theor. Biol.* **260**: 460-473.

Parker, G.A., Ball, M.A., Chubb, J.C., Hammerschmidt, K. & Milinski, M. 2009c. When should a trophically transmitted parasite manipulate its host? *Evolution* **63**: 448-458.

Parker, G.A., Chubb, J.C., Ball, M.A. & Roberts, G.N. 2003. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature* **425**: 480-484.

Perrot-Minnot, M.-J. 2004. Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Int. J. Parasitol.* **34**: 45-54.

Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. Investigating candidate neuromodulatory systems underlying parasitic manipulation: concepts, limitations and prospects. *J. Exp. Biol.* In press.

Perrot-Minnot, M.-J., Maddaleno, M., Balourdet, A. & Cézilly, F. 2012. Host manipulation revisited: no evidence for a causal link between altered photophobia and increased trophic transmission of amphipods infected with acanthocephalans. *Funct. Ecol.* **26**: 1007-1014.

- Plaistow, S.J., Bollache, L. & Cézilly, F. 2003. Energetically costly precopulatory mate-guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Anim. Behav.* **65**: 683-691.
- Plaistow, S.J., Troussard, J.-P. & Cézilly, F. 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 346-351.
- Poulin, R. 1995. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *Int. J. Parasitol.* **25**: 1371-1383.
- Poulin, R. 2007. *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton University Press, Princeton.
- Poulin, R. 2010. Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. *Adv. Stud. Behav.* **41**: 151-186.
- Poulin, R., Curtis, M.A. & Rau, M.E. 1992. Effects of *Eubothrium salvelini* (Cestoda) on the behaviour of *Cyclops vernalis* (Copepoda) and its susceptibility to fish predators. *Parasitology* **105**: 265-271.
- Poulin, R., Fredensborg, B.L., Hansen, E. & Leung, T.L.F. 2005. The true cost of host manipulation by parasites. *Behav. Proc.* **68**: 241-244.
- Poulin, R., Giari, L., Simoni, E. & Dezfili, B.S. 2003. Effects of conspecifics and heterospecifics on individual worm mass in four helminth species parasitic in fish. *Parasitol. Res.* **90**: 143-147.
- Poulin, R. & Thomas, F. 1999. Phenotypic variability induced by parasites: extent and evolutionary implications. *Parasitol. Today* **15**: 28-32.
- Rigaud, T. & Moret, Y. 2003. Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression? *Parasitology* **127**: 571-577.

- Rigaud, T. & Haine, E.R. 2005. Conflict between co-occurring parasites as a confounding factor in manipulation studies. *Behav. Proc.* **68**: 259-262.
- Rogers, M.E. & Bates, P.A. 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *Plos Path.* **3**: 818-825.
- Schmidt, G.D. 1985. Development and life cycles. In: *Biology of the Acanthocephala* (D.W.T. Crompton & B.B. Nickol, eds), pp. 273-305. Cambridge University Press, New-York.
- Schwartz, A. & Koella, J.C. 2001. Trade-offs, conflicts of interests and manipulation in *Plasmodium*-mosquito interactions. *Trends Parasitol.* **17**: 189-194.
- Seppälä, O. & Jokela, J. 2008. Host manipulation as a parasite transmission strategy when manipulation is exploited by non-host predators. *Biol. Lett.* **4**: 663-666.
- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E.T. 2005. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Anim. Behav.* **70**: 889-894.
- Sparkes, T.C., Wright, V.M., Renwick, D.T., Weil, K.A., Talkington, J.A. & Milhalyov, M. 2004. Intra-specific host sharing in the manipulative parasite *Acanthocephalus dirus*: does conflict occur over host modification? *Parasitology* **129**: 335-340.
- Steinauer, M.L., Nickol, B.B. & Orti, G. 2007. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite. *Mol. Ecol.* **16**: 4097-4109.
- Tain, L., Perrot-Minnot, M.-J. & Cézilly, F. 2006. Altered host behaviour and brain serotonergic activity caused by acanthocephalans: evidence for specificity. *Proc. R. Soc. B* **273**: 3039-3045.
- Taraschewski, H. 2000. Host-parasite interactions in acanthocephala: a morphological approach. *Adv. Parasitol.* **46**: 1-179.
- Thomas, F., Adamo, S. & Moore, J. 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behav. Proc.* **68**: 185-199.

Thomas, F., Brodeur, J., Maure, F., Franceschi, N., Blanchet, S. & Rigaud T. 2011. Intraspecific variability in host manipulation by parasites. *Inf. Genet. Evol.* **11**: 262-269.

Thomas, F., Fauchier, J. & Lafferty, K.D. 2002. Conflict of interest between a nematode and a trematode in an amphipod host: test of the “sabotage” hypothesis. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51**: 296-301.

Thomas, F., Poulin, R. & Brodeur, J. 2010. Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* **119**: 1217-1223.

Thomas, F., Rigaud, T. & Brodeur, J. 2012. Evolutionary routes leading to host manipulation by parasites. In: *Host manipulation by parasites* (D.P. Hughes, J. Brodeur & F. Thomas, eds), pp. 16-33. Oxford University Press, Oxford.

Thompson, S.N. & Kavaliers, M. 1994. Physiological bases for parasite-induced alterations in host behaviour. *Parasitology* **109**: S119-S138.

Vale, P.F. & Little, T.J. 2009. Measuring parasite fitness under genetic and thermal variation. *Heredity* **103**: 102-109.

Verweyen, L., Klimpel, S. & Palm, H.W. 2011. Molecular phylogeny of the Acanthocephala (class Palaeacanthocephala) with a paraphyletic assemblage of the orders Polymorphida and Echinorhynchida. *Plos One* **6**: e28285.

Webster, J.P. & McConkey, G.A. 2010. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. *Folia Parasitol.* **57**: 95-104.

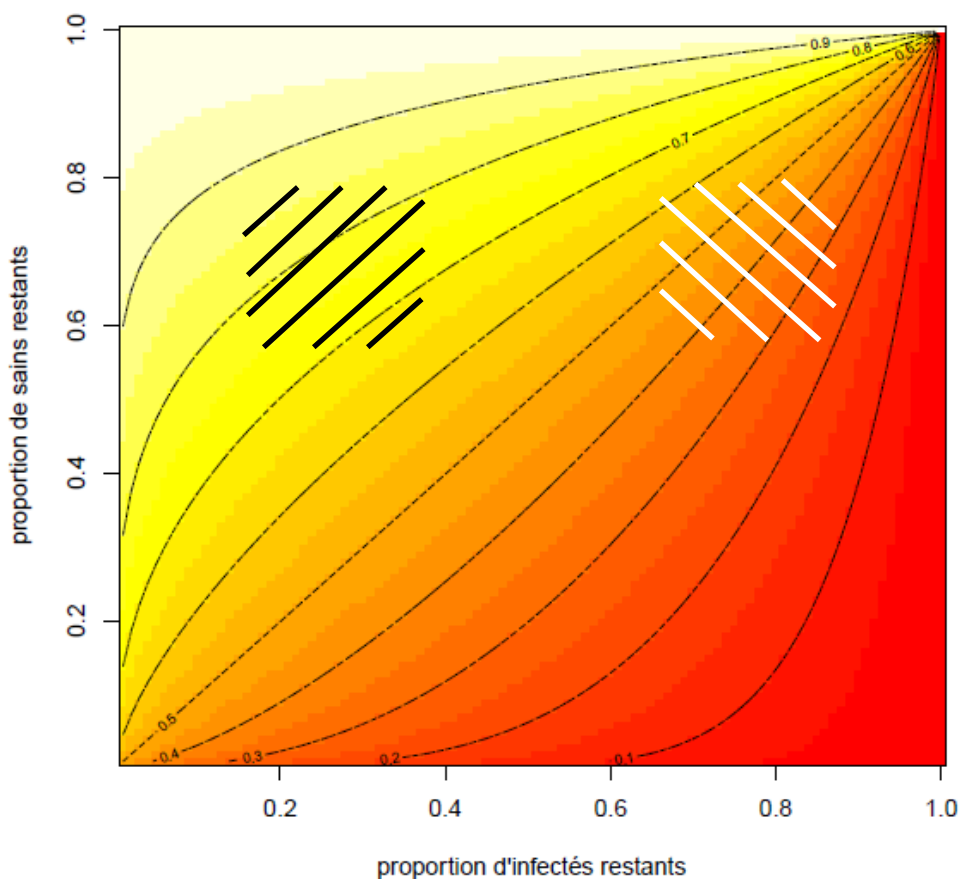
Wedekind, C. & Milinski, M. 1996. Do three-spined sticklebacks avoid consuming copepods, the first intermediate host of *Schistocephalus solidus*?—An experimental analysis of behavioural resistance. *Parasitology* **112**: 371-383.

Weinreich, F., Benesh, D.P. & Milinski, M. 2012. Suppression of predation on the intermediate host by two trophically-transmitted parasites when uninfected. *Parasitology*. In press.

Wellnitz, T. 2005. Parasite-host conflicts: winners and losers or negotiated settlements? *Behav. Proc.* **68**: 245-246.

Annexes

Annexe 1



Annexe 1. Représentation théorique de l'indice de préférence (indice de Manly, voir article 1) permettant d'évaluer la prédation sélective d'un hôte potentiel envers des proies infectées ou des proies non-infectées. Les lignes dans la figure sont les variations de l'indice de préférence (de 0.1 à 0.9) en fonction des proportions de proies infectées et saines restant à la fin de l'expérience. Plus l'indice est faible (plus la figure est rouge) et plus les individus sains sont sélectivement prédatés ; plus l'indice est fort (plus la figure est jaune) et plus les individus infectés sont sélectivement prédatés. Les lignes hachurées noires représentent la gamme d'indices généralement obtenus lors d'expériences de prédation offrant des proies saines et des proies infectées et manipulées (par un stade parasitaire infectieux) ; ceux-ci vont de 0.7 à 0.9 environ (forte préférence pour les individus infectés, avec une faible variance). Les lignes hachurées blanches représentent la gamme d'indices généralement obtenus lors d'expériences de prédation offrant des proies saines et des proies infectées et protégées (par un stade parasitaire non-infectieux) ; ceux-ci vont de 0.2 à 0.6 environ (préférence pour les individus infectés peu voire pas significative, dû notamment à la forte variance entre les expériences). Il est intéressant de noter qu'entre les expériences, la proportion de proies saines consommée est plutôt constante. La proportion de proies infectées consommée est la plus variable, dépendant du comportement plus ou moins altéré de ce type de proies.

Annexe 2

Article 5

Dianne, L., Bollache, L., Lagrue, C., Franceschi, N. & Rigaud T. 2012. Larval size in acanthocephalan parasites: Influence of intraspecific competition and effects on intermediate host behavioural changes. *Parasites & Vectors* **5**: 166.

Pendant ma thèse, j'ai eu l'occasion de valoriser les travaux que j'avais effectués en Master 1, sous la direction de Nathalie Franceschi et de Thierry Rigaud. Les résultats de ces travaux ont été publiés récemment dans la revue *Parasites & Vectors*. Par souci de logique et de continuité, je n'ai pas intégré cette étude au sein même de ma thèse, son sujet étant assez éloigné du contenu des travaux que je viens de vous présenter. En effet, cette étude porte sur les conflits intraspécifiques entre cystacanthes de *P. laevis* pour les ressources de leur hôte intermédiaire *G. pulex*. Grâce à des infestations expérimentales de gammares, nous avons recherché les effets de la compétition entre parasites sur la taille moyenne atteinte par les cystacanthes dans un hôte, puis nous avons étudié le lien entre taille du parasite et la manipulation comportementale de l'hôte qu'il induit. D'après nos résultats, la compétition entre cystacanthes réduit la taille moyenne atteinte par les parasites, par rapport à une situation sans compétition. De plus, la taille des cystacanthes est positivement corrélée à l'intensité de la manipulation comportementale de l'hôte, mais seulement dans un contexte sans compétition. Dès lors que plus d'un parasite co-infectent le même hôte intermédiaire, taille moyenne des parasites et manipulation comportementale ne sont plus corrélées.

Je vous propose de retrouver l'intégralité de cette étude dans cette annexe.

RESEARCH

Open Access

Larval size in acanthocephalan parasites: Influence of intraspecific competition and effects on intermediate host behavioural changes

Lucile Dianne^{1*}, Loïc Bollache¹, Clément Lagrue^{1,2}, Nathalie Franceschi¹ and Thierry Rigaud¹

Abstract

Background: Parasites often face a trade-off between exploitation of host resources and transmission probabilities to the next host. In helminths, larval growth, a major component of adult parasite fitness, is linked to exploitation of intermediate host resources and is influenced by the presence of co-infecting conspecifics. In manipulative parasites, larval growth strategy could also interact with their ability to alter intermediate host phenotype and influence parasite transmission.

Methods: We used experimental infections of *Gammarus pulex* by *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala), to investigate larval size effects on host behavioural manipulation among different parasite sibships and various degrees of intra-host competition.

Results: Intra-host competition reduced mean *P. laevis* cystacanth size, but the largest cystacanth within a host always reached the same size. Therefore, all co-infecting parasites did not equally suffer from intraspecific competition. Under no intra-host competition (1 parasite per host), larval size was positively correlated with host phototaxis. At higher infection intensities, this relationship disappeared, possibly because of strong competition for host resources, and thus larval growth, and limited manipulative abilities of co-infecting larval acanthocephalans.

Conclusions: Our study indicates that behavioural manipulation is a condition-dependant phenomenon that needs the integration of parasite-related variables to be fully understood.

Keywords: *Pomphorhynchus laevis*, *Gammarus pulex*, Intraspecific competition, Parasite larval size, Host behavioural manipulation, Phototaxis

Background

Parasitic organisms have to exploit hosts to optimize growth and/or transmission while coping with the limited amount of host resources. Trade-offs between damaging the host when exploiting its resources and benefits taken from this exploitation is general in parasites. Macro-parasite fitness is often linked to intra-host growth, resulting in intraspecific variations in individual body size. Parasites with complex life-cycles exploit one or several intermediate hosts before reaching the definitive host where they mature and reproduce. Consequently, larger larval sizes in intermediate hosts are associated with fitness benefits in definitive hosts like

increased establishment success and survival [1-3], or larger adult body size and higher fecundity [4]. However, larval stages of such parasites face trade-offs between high growth rate and prudent exploitation of intermediate hosts. Directional selection towards large larval stages should thus be stabilized by the necessity to maintain intermediate host viability until parasite transmission [5]. Parasite size is not only modulated by host characteristics and evolutionary trade-offs, it is also strongly influenced by the presence and number of other parasites sharing the same host [4,6-9]. Studies on intra- and interspecific competition between macro-parasites are common, both in intermediate and definitive hosts e.g. [4,8,10-18]. This intra-host competition generally induces a negative relationship between individual size and parasite load e.g. [2,4,8,9,16,19].

* Correspondence: lucile.dianne@u-bourgogne.fr

¹Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000, Dijon, France

Full list of author information is available at the end of the article

Many complex-life cycle parasites have developed the ability to alter the phenotype of their intermediate hosts – increasing transmission probabilities –, a phenomenon called parasitic manipulation [20–24]. Growth strategies could thus interact with manipulation abilities since both are assumed to be energetically costly [21]. Franceschi *et al.* showed that developmental rates (i.e. time to reach the infective stage) of acanthocephalan larvae traded-off with individual parasite manipulation ability [23]. Slow developing larvae eventually induced much higher manipulation intensities (i.e. phototaxis reversal) in intermediate hosts. Two studies on cestode parasites support the idea that larger larval size favours parasitic manipulation [24,25]. However, in these parasites, size is correlated with age. Whether apparent size effects on host manipulation were due to parasite age (as observed in an acanthocephalan; [26]) or if it was a direct size effect cannot be discriminated.

Pomphorhynchus laevis is a fish acanthocephalan using amphipod crustaceans as intermediate hosts. Several amphipod behavioural traits are altered by *P. laevis* [27–31]. Notably, phototaxis is reversed after the parasite reaches infective cystacanth stage [26]. Manipulation intensity is highly variable and this variability is still incompletely understood. Factors affecting behavioural manipulation intensity can be environmental (e.g. time of day and season, see respectively [30] and [23]) or “parasite-related” (e.g. cystacanth age and larval developmental rate; [23,26]). However, effects of final cystacanth size on behavioural manipulation have never been investigated. Origins of size variations in *P. laevis* cystacanths are also poorly documented although individual cystacanth size is influenced by inter- and intraspecific competition [8,32].

Using experimental infection of *G. pulex* by *P. laevis*, we investigated whether cystacanth size modulates the intensity of host behavioural alterations. Since some parasite life-history traits vary between parasite strains (i.e. genetic lineages; [23]), we evaluated size differences between parasite sibships and tested if these values influenced their ability to alter amphipods phototaxis. These tests were made under different degrees of intra-host competition (single infections vs. infections involving two or more than two parasites). To avoid any confounding effect of parasite age on size, all experimental infections were synchronous.

Methods

Host and parasite collection

Gammarus pulex were collected in a small tributary of the Suzon River (Burgundy, eastern France; 47°24'12.6"N, 4°52'58.2"E). This population is known to be free of *P. laevis* [26]. In the laboratory, gammarids were acclimatized for 4 weeks prior to infection experiments

in 37×55×10 cm aquaria containing dechlorinated, UV-treated and aerated tap water. Temperature was maintained at 15 ± 1°C under a 12:12 hours light:dark cycle and elm (*Ulmus laevis*) leaves were supplied as food.

Naturally-infected chubs (*Leuciscus cephalus*) were captured by electrofishing in the Ouche River (47°17'44.92"N, 5°02'44.63"E). Fish were anaesthetized using a Eugenol solution (Sigma-Aldrich), killed by decapitation and dissected to collect adult parasites from their intestines. Eggs were obtained by dissecting female acanthocephalans and placed in 400 µL of water. Parasite tissues were preserved in 300 µL of 100 % ethanol for molecular identification since two closely-related species of acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *P. tereticollis*, co-occur in Burgundy [33]. This molecular identification was made following Franceschi *et al.* [26].

Infection procedure

Maturity of parasite eggs from each clutch was assessed under a Nikon compound microscope. Egg clutches of eight female *P. laevis* coming from eight different fish were selected according to egg maturity for experimental infection. In this experiment, a clutch is considered as a “parasite sibship” [23].

Prior to infection, gammarids were deprived of food for 24 h. Controlled infections were then carried out as described in Franceschi *et al.* [26]. Only male gammarids were used to avoid potential confounding effects of female reproductive stage on infection outcomes. Two amphipods were placed in a 6 cm diameter dish filled with water. Parasite eggs were deposited on a 1 cm² dry elm leaf placed in the dish (100 eggs per gammarid). Amphipods were then allowed to feed for 48 h. For each treatment (one treatment corresponding to infection with one parasite sibship), 108 male gammarids were used. Uninfected leaves were provided to control groups. Amphipods were then rinsed, placed in 0.5 L aquaria and maintained under standard conditions (water at 15 ± 1°C, 12:12 hours light:dark cycle). Eighteen individuals from the same treatment (exposed to eggs from the same female parasite) were haphazardly assigned to each aquarium.

From the sixth week after infection, gammarids were inspected once a week under a binocular microscope to detect the presence of parasites. Individuals harbouring visible *P. laevis* larvae were isolated. These gammarids were then checked twice a week until parasites reached cystacanth stage (final larval stage infective to definitive hosts). Infected host reaction to light was measured a day after the parasite had reached cystacanth stage and again fifteen days later. These measures are thereafter referred as “early” and “late” phototaxis, respectively [26].

A single gammarid was introduced into a horizontal tube filled with aerated water and divided into a dark and a light zone of equal size. After 5 min of acclimatization, amphipod position was recorded every 30 s for 5 min; a score of 0 was given to individuals located in the dark area and a score of 1 was given to those in the lighted area. Summed scores ranged from 0 (always in the dark, strongly photophobic) to 10 (always in the light, strongly photophilic). Gammarids were then measured (body height at the level of the fourth coxal plate basis) using a Nikon SMZ 1500 stereoscopic microscope and Lucia G 4.81 software and dissected. Cystacanths were counted and measured (length and width). Cystacanth volume was then calculated as the volume of an ellipsoid: $V = (\pi LW^2)/6$, with L and W being respectively length and width of the cystacanth [34].

Statistics

All tests were performed using JMP 7.0 Software (SAS Institute Inc.) and were two-tailed. P-values < 0.05 were considered significant.

Two linear models were carried out to investigate the effects of parasite sibship (i.e. clutch) and infection intensity (i.e. number of cystacanths per host, divided into three categories: 1, 2 and more than 2 cystacanths, respectively) (i) on mean cystacanth volume within a host and (ii) on variation coefficient of cystacanth volume. Host size may also partly explain parasite size [e.g. 2, 8], and was therefore included in the models. A linear model was also used to analyse the effects of these same factors on the size of the larger cystacanth per host.

Phototaxis scores never met normality nor homoscedasticity conditions, even after transformations. Therefore, to allow analyses of these two factors and their interaction simultaneously, early and late phototaxis scores were transformed into two categorical variables (i.e. scores below and above median scores). These categories were analysed using a logistic regression model. Early phototaxis and late phototaxis were separated in each analysis.

In all statistical models, non significant interactions and factors were removed from the analyses.

Results

Parasite volume per host

Experimentally infected amphipods contained between 1 and 8 parasites (see distribution on Figure 1a). Infection intensity was not influenced by parasite sibship (Likelihood ratio: $\chi^2_7 = 10.82$, $P = 0.15$; Figure 1b). Development of these parasites was almost synchronized (68.5 % of the 238 parasites reached the cystacanth stage 61 days post-exposure, the others one week later), and did not differ between sibship (Kruskal-Wallis: $\chi^2_7 = 6.54$, $P = 0.47$).

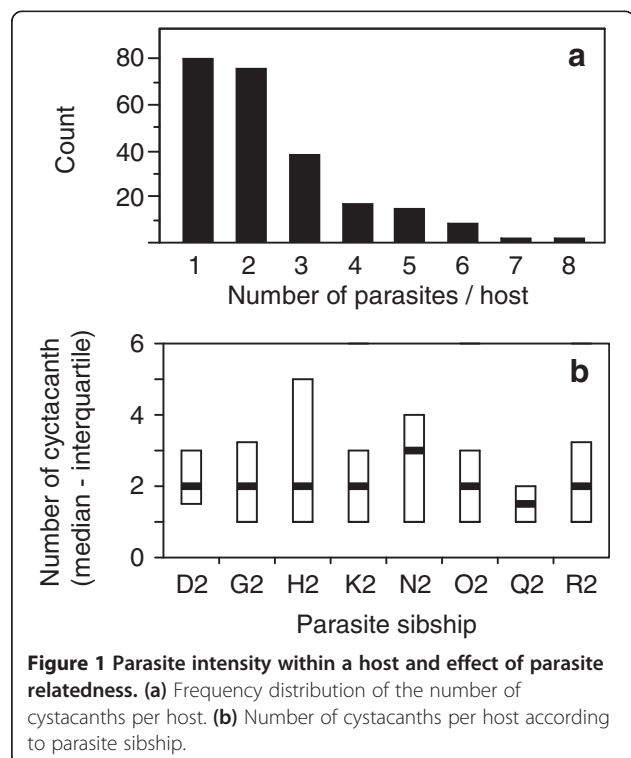


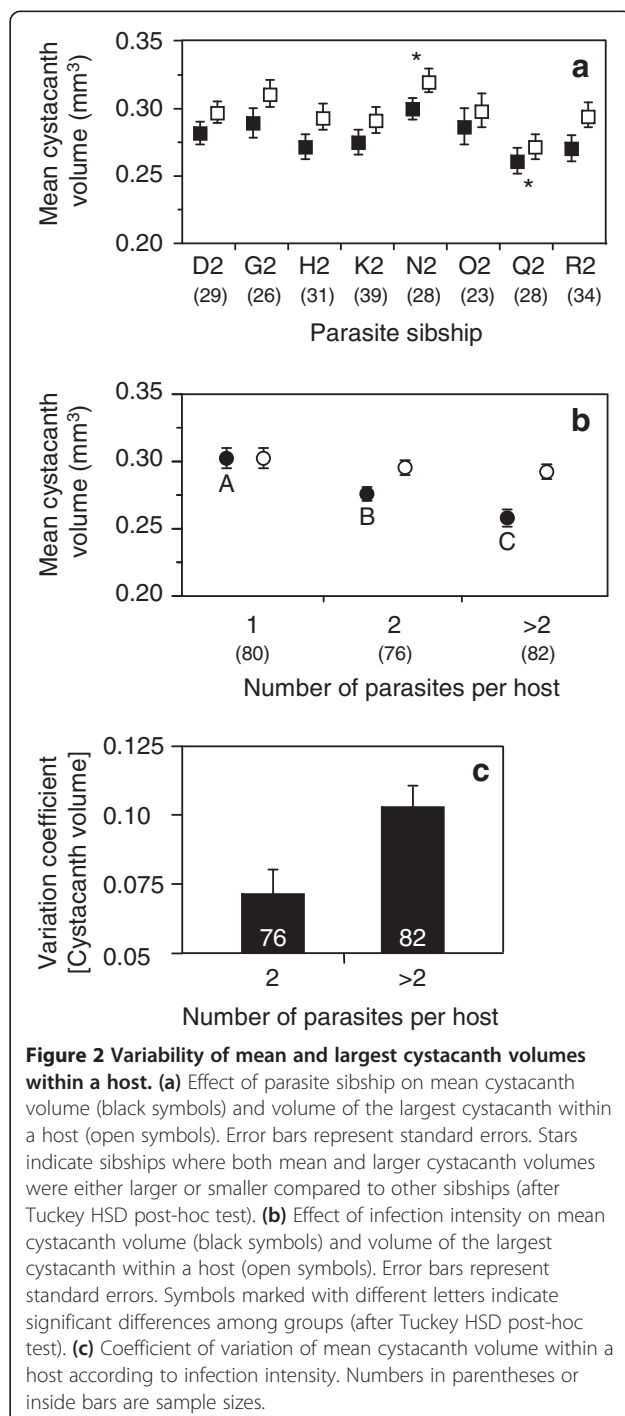
Figure 1 Parasite intensity within a host and effect of parasite relatedness. (a) Frequency distribution of the number of cystacanths per host. (b) Number of cystacanths per host according to parasite sibship.

Pomphorhynchus laevis cystacanth volume was influenced by both parasite sibship and infection intensity, but not by host size nor by interactions between these factors (Global linear model: $F_{9, 228} = 6.06$, $P < 0.0001$; Sibship effect: $F_{7, 228} = 2.83$, $P = 0.008$; Parasite intensity effect: $F_{2, 228} = 20.81$, $P < 0.0001$). Cystacanths from two sibships differed significantly from other clutches (Figure 2a), and mean cystacanth volume per host decreased with infection intensity (Figure 2b). Interestingly, the volume of the largest cystacanth was not influenced by host size or intensity of infection, but only by parasite sibship ($F_{7, 230} = 2.06$, $P = 0.047$; Figure 2a, b). Both parasite sibships that showed significantly different sizes of the largest cystacanth also showed differences in mean cystacanth size (Figure 2a).

Only infection intensity influenced the variation coefficient of cystacanth volume within a host; host size, parasite sibship and interactions were not significant (Global model: $F_{1, 156} = 14.72$, $P = 0.0002$). Parasite size was more variable in hosts with more than two cystacanths than in hosts with only two co-infecting *P. laevis* (Figure 2c). It is worth noting that this trend remains if the category "more than two cystacanths" is subdivided into more categories (results not shown).

Host phototaxis

Overall, early phototaxis scores had a median of 1 (interquartiles: 0 – 3), and late phototaxis scores had a median of 6 (interquartiles: 2 – 9). For analyses, we therefore



categorized our scores as “scores <1” and “scores ≥ 1” for early phototaxis, and “scores <6” and “scores ≥ 6” for late phototaxis. Since infection intensity and cystacanth volume are two dependant variables, this relationship was analyzed separately according to infection intensity.

Early phototaxis scores were not influenced by parasite sibship or mean cystacanth volume (Global models: $\chi^2 = 1.38$, $P = 0.24$; $\chi^2 = 1.54$, $P = 0.23$, $\chi^2 = 0.02$, $P = 0.89$

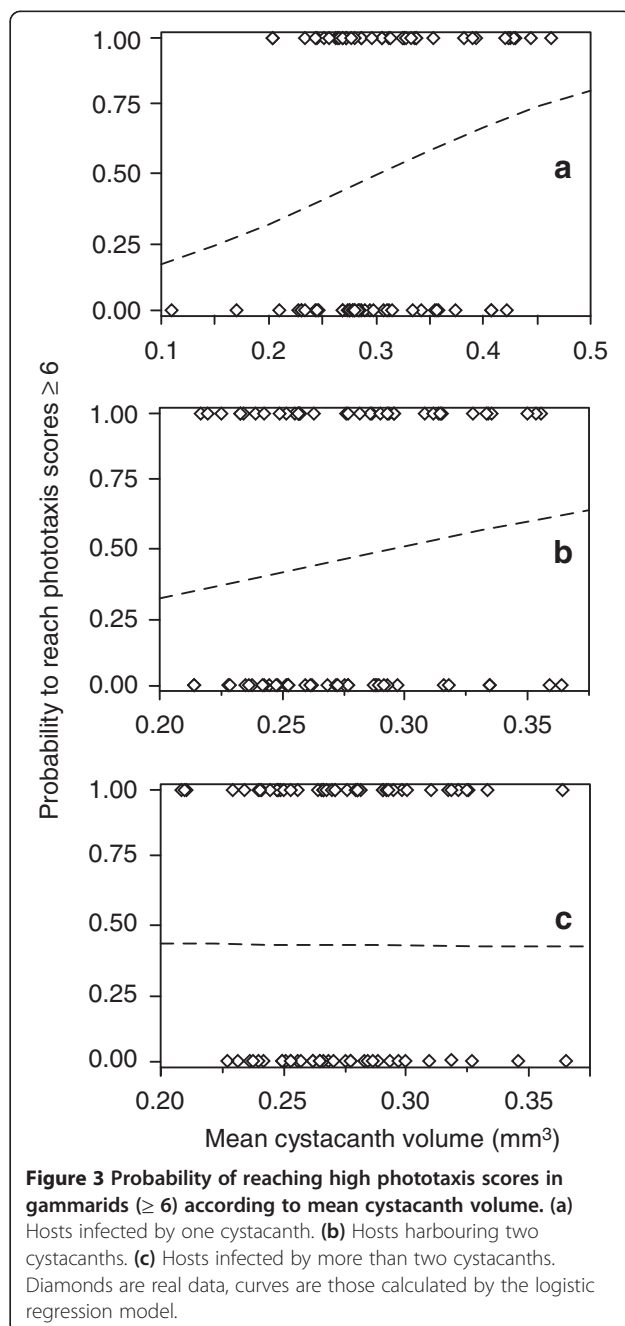
for one, two and more than two parasites per host, respectively).

In the analyses of late phototaxis scores, parasite sibship was never retained as a significant factor. Mean cystacanth volume had a weak but significant effect on late phototaxis in single infections, larger parasites having higher probabilities of expressing high phototaxis scores ($\chi^2 = 4.11$, $P = 0.04$, Figure 3a). In hosts infected with two and more than two parasites, mean cystacanth volume did not influence late phototaxis ($\chi^2 = 1.48$, $P = 0.22$ and $\chi^2 = 0.001$, $P = 0.97$, respectively; Figure 3b, c). There was no relationship between the variation coefficient of cystacanth volume and host late phototaxis ($\chi^2 = 0.34$, $P = 0.56$ and $\chi^2 = 0.15$, $P = 0.70$ for hosts infected by two *P. laevis* and more than two parasites, respectively). Finally, analyses using the volume of the largest cystacanth within a host as a factor were similar to those using the mean cystacanth volume; largest cystacanth volume had no effect on early or late phototaxis in hosts harbouring two and three or more parasites ($\chi^2 = 1.65$, $P = 0.20$ and $\chi^2 = 0.04$, $P = 0.85$, respectively for early phototaxis scores; $\chi^2 = 1.60$, $P = 0.21$ and $\chi^2 = 0.12$, $P = 0.73$, respectively for late phototaxis).

Discussion

Our study confirmed that *P. laevis* cystacanth size was influenced by intraspecific competition. This is consistent with previous studies on crowding effects on acanthocephalan size [8,14,32]. In particular, Cornet [32] found similar results when co-infecting *P. laevis* were unrelated (i.e. originated from different clutches). Interestingly, our results indicate that the size achieved by the largest cystacanth is always the same, regardless of the number of competitors. All cystacanths sharing a host may thus not equally suffer from competition. As a consequence, cystacanth size is more variable in hosts harbouring three or more cystacanths. Competition between cystacanths seemed to act on both cystacanth size variability and mean cystacanth size.

Since the largest cystacanth within a host reached a similar size in single and multiple infections, total parasite volume increased with the number of co-infecting cystacanths. Such correlation is believed to occur mostly among genetically unrelated parasites because related parasites should exploit a common host in a more co-operative way [35-37]. Here, all competing parasites came from the same clutch and were therefore *a priori* strongly related. We thus follow Keeney *et al.* [38] in their conclusion that genetic relatedness among co-infecting parasites is not inevitably the main factor acting on parasite growth. In addition, we found significant differences in *P. laevis* size between sibships. This difference was mainly due to two sibships where both the average and the largest cystacanth sizes were higher or



lower than in other sibships. This variation suggests either genetic or maternal effects on larval size. Since each female parasite came from a different fish definitive host, effects of female *P. laevis* environment (i.e. definitive host) on offspring life-history traits are also possible.

In single infections, larger cystacanths had higher probabilities of inducing strong late phototaxis scores in their hosts. Positive relationships between host manipulation and parasite size have been found in few other host-parasite systems [25,39]. In these cases, it was difficult to discriminate between size and age of parasites as

the main trigger of this relationship. Here, potential age effects are eliminated by our synchronized experimental procedure. Larger cystacanths should thus be advantaged in the absence of intra-host competition, assuming that higher phototaxis scores in amphipods increase *P. laevis* transmission probabilities to the final host. Franceschi *et al.* [23] previously found that early phototaxis is influenced by the rapidity of *P. laevis* development (fast-developing cystacanths altered less host behaviour than their slow-developing conspecifics). Both components of host behavioural modification (i.e. early and late phototaxis) are therefore modulated by two different parasite life-history traits. Early phototaxis, i.e. intensity of behavioural change induced by a parasite that has just reached the cystacanth stage, is influenced by parasite developmental rate. Late phototaxis, i.e. maximal intensity of behavioural change induced by an old cystacanth, is influenced by final larval size.

We found no effect of the number of co-infecting parasites on host behavioural manipulation intensity, a result that contrasts with those of Franceschi *et al.* [26]. However, this previous study used a mix of parasites from different clutches, and of different geographic origins, for their experimental infections. The difference between the two studies can therefore come from differences in the changes in the intensity of phototaxis scores among parasite populations [40]. If parasite number *per se* did not influence host behavioural alteration, the positive relationship between mean cystacanth size and host phototaxis was influenced by the number of parasites. This relationship was detected in single infections but disappeared in multiple infections. The absence of such a relationship under intra-host competition remains to be explained. Brown *et al.* [25] suggested that the largest of co-infecting parasites should have the strongest effect on host behavioural alterations. However, our data do not support this hypothesis. We found that the size of the largest *P. laevis* cystacanth did not decrease with infection intensity, indicating that the competition for size among co-infecting cystacanths affect all but this “winner” individual. Nevertheless, no effect of this “winner” parasite size on behavioural changes was found. Absence of relationship between parasite size and host manipulation in multiple infections could be due to parasites competing to reach high larval size not being able to invest in further behavioural manipulation, as parasites would do under no competition.

Conclusion

By stressing parasite size effects on host manipulation, this study illustrates the complexity of the variability observed in parasite-induced host alterations, emphasizing behavioural manipulation as a highly condition-dependant phenomenon [41]. The need to account for

all possible factors (parasite, host and/or environment-related) seems crucial to fully understand competition patterns between parasites and possible effects on transmission rates.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

TR and LB conceived the study. LD and NF performed the experiment, collected the data and outlined the manuscript. LD, CL and TR realized the analyses. LD, TR and CL wrote the MS. All authors read and corrected earlier versions and approved the final manuscript.

Acknowledgements

LD was funded by a joined doctoral grant from the CNRS and the Conseil Régional de Bourgogne and NF by a doctoral grant from the MENESR. CL was funded by a post-doctoral grant (Programme PARI, Agrale 5) and the study by a research grant (Grant n°9201/AA/O/040/S00619) from the Conseil Régional de Bourgogne.

Author details

¹Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000, Dijon, France. ²Present address: Department of Zoology, University of Otago, P.O. Box 56, Dunedin 9054, New Zealand.

Received: 9 July 2012 Accepted: 31 July 2012

Published: 9 August 2012

References

- Rosen R, Dick TA: Development and infectivity of the procercoid of *Triaenophorus crassus* Forel and mortality of the first intermediate host. *Can J Zool* 1983, **61**:2120–2128.
- Steinauer ML, Nickol BB: Effect of cystacanth body size on adult success. *J Parasitol* 2003, **89**:251–254.
- Benesh DP, Hafer N: Growth and ontogeny of the tapeworm *Schistocephalus solidus* in its copepod first host affects performance in its stickleback second intermediate host. *Parasit Vectors* 2012, **5**:90.
- Fredensborg BL, Poulin R: Larval helminths in intermediate hosts: Does competition early in life determine the fitness of adult parasites? *Int J Parasitol* 2005, **35**:1061–1070.
- Lafferty KD, Kuris AM: Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends Ecol Evol* 2002, **17**:507–513.
- Gordon DM, Whitfield PJ: Interactions of the cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* and *Raillietina cesticillus* in their intermediate host, *Tribolium confusum*. *Parasitology* 1985, **90**:421–431.
- Wedekind C, Christen M, Scharer L, Treichel N: Relative helminth size in crustacean hosts: in vivo determination, and effects of host gender and within-host competition in a copepod infected by a cestode. *Aquatic Ecol* 2000, **34**:279–285.
- Dezfuli BS, Giari L, Poulin R: Costs of intraspecific and interspecific host sharing in acanthocephalan cystacanths. *Parasitology* 2001, **122**:483–489.
- Brown SP, De Lorigeril J, Joly C, Thomas F: Field evidence for density-dependent effects in the trematode *Microphallus papillorobustus* in its manipulated host, *Gammarus insensibilis*. *J Parasitol* 2003, **89**:668–672.
- Dezfuli BS, Volponi S, Beltrami I, Poulin R: Intra- and interspecific density-dependent effects on growth in helminth parasites of the cormorant, *Phalacrocorax carbo sinensis*. *Parasitology* 2002, **124**:537–544.
- Thomas F, Fauchier J, Lafferty KD: Conflict of interest between a nematode and a trematode in an amphipod host: test of the "sabotage" hypothesis. *Behav Ecol Sociobiol* 2002, **51**:296–301.
- Poulin R, Giari L, Simoni E, Dezfuli BS: Effects of conspecifics and heterospecifics on individual worm mass in four helminth species parasitic in fish. *Parasitol Res* 2003, **90**:143–147.
- Poulin R, Nichol K, Latham ADM: Host sharing and host manipulation by larval helminths in shore crabs: cooperation or conflict? *Int J Parasitol* 2003, **33**:425–433.
- Benesh DP, Valtanen ET: Proximate factors affecting the larval life history of *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala). *J Parasitol* 2007, **93**:742–749.
- Laguer C, McEwan J, Poulin R, Keeney DB: Co-occurrences of parasite clones and altered host phenotype in a snail-trematode system. *Int J Parasitol* 2007, **37**:1459–1467.
- Laguer C, Poulin R: Intra- and interspecific competition among helminth parasites: Effects on *Coitocaecum parvum* life history strategy, size and fecundity. *Int J Parasitol* 2008, **38**:1435–1444.
- Dianne L, Rigaud T, Léger E, Motreuil S, Bauer A, Perrot-Minnot MJ: Intraspecific conflict over host manipulation between different larval stages of an acanthocephalan parasite. *J Evol Biol* 2010, **23**:2648–2655.
- Benesh DP: Intensity-dependent host mortality: what can it tell us about larval growth strategies in complex life cycle helminths? *Parasitology* 2011, **138**:913–925.
- Michaud M, Milinski M, Parker GA, Chubb JC: Competitive growth strategies in intermediate hosts: Experimental tests of a parasite life-history model using the cestode, *Schistocephalus solidus*. *Evol Ecol* 2006, **20**:39–57.
- Moore J: *Parasites and the behavior of animals*. New-York: Oxford University Press; 2002.
- Thomas F, Adamo S, Moore J: Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behav Proc* 2005, **68**:185–199.
- Lefèvre T, Lebarbenchon C, Gauthier-Clerc M, Missé D, Poulin R, Thomas F: The ecological significance of manipulative parasites. *Trends Ecol Evol* 2009, **24**:41–48.
- Franceschi N, Bollache L, Cornet S, Bauer A, Motreuil S, Rigaud T: Co-variation between the intensity of behavioural manipulation and parasite development time in an acanthocephalan-amphipod system. *J Evol Biol* 2010, **23**:2143–2150.
- Ness JH, Foster SA: Parasite-associated phenotype modifications in threespine stickleback. *Oikos* 1999, **85**:127–134.
- Brown SP, Looi G, Grenfell BT, Guégan JF: Host manipulation by *Ligula intestinalis*: accident or adaptation? *Parasitology* 2001, **123**:519–529.
- Franceschi N, Bauer A, Bollache L, Rigaud T: The effects of parasite age and intensity on variability in acanthocephalan-induced behavioural manipulation. *Int J Parasitol* 2008, **38**:1161–1170.
- Bauer A, Trouvé S, Grégoire A, Bollache L, Cézilly F: Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invasive species. *Int J Parasitol* 2000, **30**:1453–1457.
- Perrot-Minnot MJ: Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Int J Parasitol* 2004, **34**:45–54.
- Kaldonski K, Perrot-Minnot MJ, Cézilly F: Differential influence of two acanthocephalan parasites on the antipredator behaviour of their common intermediate host. *Anim Behav* 2007, **74**:1311–1317.
- Laguer C, Kaldonski N, Perrot-Minnot MJ, Motreuil S, Bollache L: Modification of hosts' behavior by a parasite: Field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* 2007, **88**:2839–284.
- Dianne L, Perrot-Minnot MJ, Bauer A, Gaillard M, Léger E, Rigaud T: Protection first then facilitation: a manipulative parasite modulates the vulnerability to predation of its intermediate host according to its own developmental stage. *Evolution* 2011, **65**:2692–2698.
- Cornet S: Density-dependent effects on parasite growth and parasite-induced host immunodepression in the larval helminth *Pomphorhynchus laevis*. *Parasitology* 2011, **138**:257–265.
- Špakulová M, Perrot-Minnot MJ, Neuhaus B: Resurrection of *Pomphorhynchus tereticollis* (Rudolphi, 1809) (Acanthocephala: Pomphorhynchidae) based on new morphological and molecular data. *Helminthologia* 2011, **48**:268–277.
- Poulin R, Wise M, Moore J: A comparative analysis of adult body size and its correlates in acanthocephalan parasites. *Int J Parasitol* 2003, **33**:799–805.
- Frank SA: A kin selection model for the evolution of virulence. *Proc R Soc B: Biol Sci* 1992, **250**:195–197.
- Griffin AS, West SA: Kin selection: fact and fiction. *Trends Ecol Evol* 2002, **17**:15–20.
- Parker GA, Chubb JC, Roberts GN, Michaud M, Milinski M: Optimal growth strategies of larval helminths in their intermediate hosts. *J Evol Biol* 2003, **16**:47–54.
- Keeney DB, Bryan-Walker K, Khan N, King TM, Poulin R: The influence of clonal diversity and intensity-dependence on trematode infections in an amphipod. *Parasitology* 2009, **136**:339–348.

39. Benesh DP, Seppälä O, Valtonen ET: **Acanthocephalan size and sex affect the modification of intermediate host colouration.** *Parasitology* 2009, **136**:847–854.
40. Franceschi N, Cornet S, Bollache L, Dechaume-Moncharmont FX, Bauer A, Motreuil S, Rigaud T: **Variation between populations and local adaptation in acanthocephalan-induced parasite manipulation.** *Evolution* 2011, **64**:2417–2430.
41. Thomas F, Brodeur J, Maure F, Franceschi F, Blanchet S, Rigaud T: **Intraspecific variability in host manipulation by parasites.** *Infect Genet Evol* 2011, **11**:262–269.

doi:10.1186/1756-3305-5-166

Cite this article as: Dianne *et al.*: Larval size in acanthocephalan parasites: Influence of intraspecific competition and effects on intermediate host behavioural changes. *Parasites & Vectors* 2012 **5**:166.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Résumé

Chez les parasites à cycle complexe et à transmission trophique, des stratégies d'exploitation de l'hôte intermédiaire ont été sélectionnées, permettant à la larve de parasite d'accroître ses chances de transmission vers l'hôte définitif. Notamment, de nombreux parasites sont capables d'altérer le comportement de leur hôte intermédiaire (manipulation comportementale). Cette manipulation n'intervient que lorsque le stade larvaire du parasite est infectieux pour l'hôte définitif. Avant d'atteindre cette infectivité, le développement du stade larvaire n'est pas suffisamment avancé pour lui permettre de s'établir dans l'hôte définitif (il est dit non-infectieux). La transmission prématurée d'un stade non-infectieux, *via* la prédation de l'hôte parasité, implique alors la mort du parasite. Les parasites capables de renforcer les défenses anti-prédateurs de leur hôte intermédiaire au stade non-infectieux (i.e. de le protéger vis-à-vis de la prédation), avant de manipuler leur comportement au stade infectieux (i.e. de les exposer à la prédation par l'hôte définitif) devraient avoir été sélectionnés. Dans ces travaux de thèse, j'ai pu montrer qu'au stade larvaire non-infectieux, le parasite acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis* renforce les défenses anti-prédateurs de son hôte intermédiaire amphipode, ce qui a pour effet de diminuer ses risques de prédation, par rapport à des hôtes non-infectés. Cet effet protecteur de l'hôte intermédiaire affecte l'approvisionnement de l'amphipode, qui se nourrit moins que les amphipodes non-infectés, bien que cela n'ait aucune incidence sur l'état des réserves énergétiques de l'hôte. De même, le comportement reproducteur de l'hôte n'est pas affecté par l'infection par ce stade protecteur. Les bénéfices de cette stratégie protectrice semblent partagés entre le parasite et son hôte. Les origines de cette stratégie parasitaire sont discutées, et des perspectives écologiques à ce changement comportemental de l'hôte sont suggérées.