

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

**EFFET DE LA PLANTE HOTE SUR L'IMMUNITÉ DES  
INSECTES PHYTOPHAGES :**  
Influence du cépage de vigne sur la capacité des vers de la grappe à se  
défendre contre des bio-agresseurs



Fanny Vogelweith

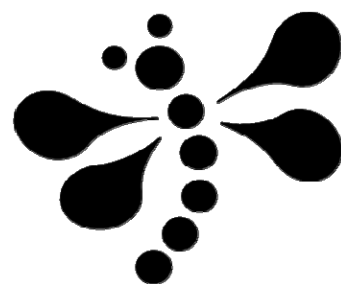
Soutenue publiquement le 13 décembre 2013

Jury

Arnaud Améline, Maître de conférences  
Loïc Bollache, Professeur  
Jérôme Moreau, Maître de conférences  
Yannick Moret, Chargé de recherches CNRS  
Yannick Outreman, Professeur  
Marylène Poirié, Professeur  
Mathieu Sicard, Professeur  
Denis Thiéry, Directeur de recherches INRA

Examineur  
Examineur  
Directeur  
Co-encadrant  
Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Co-encadrant

*A Simon*



## REMERCIEMENTS

Comme le dit si bien Euripide, « Aucun de nous ne sait ce que nous savons tous, ensemble ». Un travail de thèse, c'est avant tout un travail d'équipe, j'ai donc pas mal de personnes à remercier !

Pour commencer, je tiens à remercier mes trois directeurs de thèse, que sont Jérôme Moreau, Yannick Moret et Denis Thiéry. Je pense que je ne pouvais pas trouver de chefs qui me conviennent mieux. Vous avez su me donner confiance en me laissant gérer ma thèse comme je le souhaitais, tout en étant disponible dès que j'en avais besoin. Je ne suis pas facile à canaliser dans mes périodes de stress et vous avez réussi à me rassurer et à me faire prendre confiance en moi. Vos connaissances dans de nombreux domaines (c'est l'avantage d'avoir trois chefs, dans trois domaines différents) m'ont beaucoup appris, et m'ont permis de confronter différentes visions des choses afin de mieux cerner mon sujet. C'est toujours un plaisir de papoter avec vous trois ! Enfin, je ne sais pas si je retrouverais des chefs qui m'obligent à aller aux urgences et finissent mes manips quand je me fais casser le nez par un cheval...

Jérôme, je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu m'as apporté... Ta disponibilité, ton soutien, ta précieuse amitié et avouons-le, tes blagues pourries. Cette thèse n'aurait pas avancé aussi bien sans ta super efficacité et ton aide indispensable sur le terrain !

Yannick, tu es un peu mon antistress, toujours très rassurant, très efficace, tu as toujours l'idée à laquelle on n'avait pas pensé... C'est ça d'être le grand chef... ! Note que depuis mon M2, je n'ai arraché la tête de personne... ! ;- ) (même si ça m'a traversé l'esprit quelques fois).

Denis, la distance fait que l'on a beaucoup moins interagi, mais ton enthousiasme lors des manips que je proposais ainsi que lors des résultats m'a beaucoup encouragée. Je ne désespère pas, un jour tu sauras écrire mon nom de famille sans faute d'orthographe ! ;- )

Merci à Emmanuel Desouhant et Thierry Rigaud pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Vos conseils avisés m'auront été très précieux pendant cette thèse. Thierry, c'était bien agréable de papoter avec toi dans l'ascenseur pour aller au 4<sup>ème</sup> étage, pendant mes allers-retours du terrain. Merci également à Marylène Poirié et Mathieu Sicard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à Loïc Bollache, Yannick Outreman et Arnaud Améline pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Un grand merci aux Chambres d'Agriculture et Conseils Régionaux d'Alsace, d'Aquitaine, de Bourgogne, de Champagne-Ardenne, du Languedoc-Roussillon, du Rhône-Alpes et de Provence-Alpes-Côte-d'Azur, et bien sûr aux vignerons sans qui tout mon terrain n'aurait pas été possible.

Merci à mes « petits » stagiaires, tous plus grands que moi, de m'avoir aidée dans toutes mes expériences de thèse, que ce soit au labo ou sur le terrain. Sans vous, tout ce travail n'aurait pas été possible, et j'aurais beaucoup moins rigolé ! Merci, chronologiquement à : Bastien, Adèle, Morgane, Marie-Line, Karen, Eloïse, Alicia, Geoffrey, Sarah, Angélique, Manon, Mathilde, Jordane, Bérénice, Nina et Maxime.

Je souhaite également remercier l'ensemble de l'équipe Ecologie évolutive et du laboratoire Biogéosciences. Un grand merci à Jipé, Alouexe, Sébastien, Aude et Maria pour le soutien technique. Jipé et Alouexe, vous êtes difficilement dissociable... Nos petits repas du midi avec la traditionnelle série me manquent déjà ! Jipé, ta bonne humeur, tes blagues, tes conseils, ton soutien, nos discussions sérieuses (et/ou pas !), nos courses de chariots dans les couloirs ont été très précieux durant ces 4 années à travailler ensemble. Alouexe, toujours là quand j'ai besoin de toi ! Grâce à toi, j'ai de super diagrammes dans mes publis et dans ma thèse. Merci d'avoir eu la patience de peser les quelques

milliers de chrysalides, avec la balance et le radioréveil capricieux ;-). Les petites pauses Alouxe vont me manquer.

Séb, qu'aurais-je fait sans toi ?! Je reste et resterai toujours impressionnée par ton imagination sans faille et ton efficacité, McGyver a un adversaire de taille. Entre les portes-compteurs à bactéries, les dispositifs de comportements, la sublime salle du 4<sup>ème</sup>, le terrain etc., ton aide a été si précieuse. Grâce à toi, nous avons découvert de bons vins de Bourgogne ! Je construirai volontiers de nouveaux openfields avec Véro mais uniquement si on a une super agrafeuse ;-)

Aude et Maria, je vous ai beaucoup moins embêtées mais quand même ! Aude, merci pour le terrain. J'ai apprécié papoter de nos toutous respectifs. Enfin Maria, merci pour les conseils pratiques, toujours là même quand tu es overbookée. Merci également à Carmela pour ses précieuses corrections en anglais, Isabelle pour sa gentillesse même quand on lui amène des ordres de mission mal faits.

Un merci du côté Bordelais à Lionel pour avoir maintenu les élevages à flots et pour son téléguidage un peu compliqué dans les vignes. Merci également à Marc-Etienne de m'avoir fait découvrir les aléas de la recherche...

F-X, toi par contre, je t'ai beaucoup embêté ! Un énorme merci pour tous tes conseils et tes nombreuses explications en stats. Tu as fait preuve de beaucoup de patience avec moi, j'y suis très sensible. Tu as même réussi à me faire apprécier R. Et j'ai bien compris, Nakagawa, il est trop fort ! J'en profite pour remercier aussi Rémi et ses supers CDs et Marie-Jeanne pour ses conseils et sa bonne humeur. Merci à Frank pour la belle expérience du baguage flamants.

Merci à tous les colloc' présents et passés du bureau 314c, et il y en a eu ! Je pense bien sûr à Matthias, Lucile, Caroline, Clément, Karen, Aurélie et plus récemment Sophie. Karen, mon p'tit chou en trottinette !! J'ai passé tellement de bons moments avec toi ! Tu es un soutien moral sans faille depuis cette fameuse bière rennaise... Avec qui vais-je pouvoir dessiner Jérôme sur un ballon Courtepaille ?! Ou alors faire mumuse avec les cotons qui ferment les tubes d'accouplements ?! En tout cas, j'espère que tu continueras à regarder Kaamelott sur le terrain, histoire d'avoir d'autres répliques que... « Elle vomit ?! ». Merci d'avoir pris le temps de corriger les fautes d'orthographe de ma thèse ;-). Bien sûr, je n'oublie pas les habitants des bureaux voisins : Aurore, Cécile, Coraline, David, Denis, Emilie, Juliette, Karine, Manu, Morgan et Romain. Merci pour la bonne ambiance générale, les petites soirées à l'antre II etc. ☺ Juliette, c'était sympa nos papotages du dimanche ;-). Karine et Morgan, un jour peut être, on publiera dans le journal des papiers les plus rejetés... Qui battra le record des 8 rejets ?! Un petit clin d'œil à mes deux compagnons de galère, p'tit Séb et Aurélie. Ma petite cistude adorée, tu m'as manqué pendant ton année camarguaise !

Merci à Matthias Erb et Christelle Robert de m'avoir accueillie au Max Planck Institut de Jena, dans leur groupe pendant trois mois. Merci également à Abbie, Ricardo, Meret, Jing, Raja, Estelle, Amélie, Carla, Lena, Andrea K. et Andrea M. Christelle, merci pour ton soutien durant toutes ces années. Si je suis arrivée là, c'est un peu grâce à toi ☺

Mon Piou & mon Elo... Vous êtes les meilleurs ;-). Vous avez réussi à me supporter pendant mes phases de stress intense et vous avez toujours trouvé les mots justes. Ce que vous m'avez apporté, et m'apportez toujours, va au-delà de ce tout ce que je pourrais écrire ici. Merci tout plein ! Et Piou, les cours de Néerlandais à 1h du mat', entre deux chapitres de thèse, c'était cool ! (même si j'avoue, j'ai déjà tout oublié). Merci aussi à mon P'tit Lu croquant, et notre petite troupe, Aymeric, Cloclo, Yannick et Claudio. Mathilde, le monde serait beaucoup plus triste sans toi, merci d'être là quand il faut !

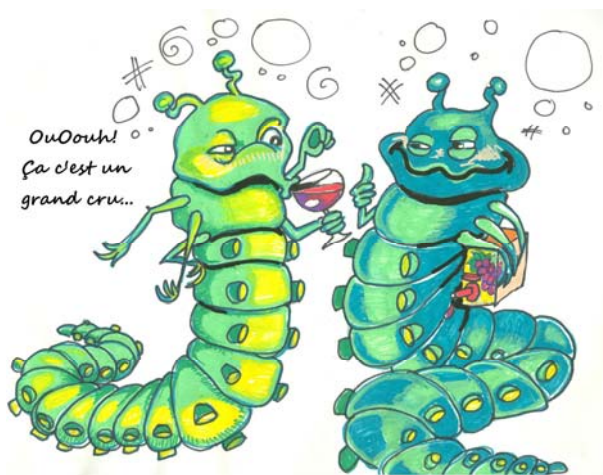
Je doute que tes sabots te permettent de tourner ces pages mais ma Prunelle, tu fais aussi partie de cette thèse. Tu as été mon bol d'air frais pendant ces trois années. Tu m'as permis d'apprendre à me contrôler, au risque de finir par terre dans les minutes suivantes. J'aimerais encore pouvoir faire de

longues balades avec toi dans les champs... Merci ma belle ! Un petit clin d'œil aux cavaliers avec qui j'ai passé de bons moments... Sophie, Pauline F., Carine, Maeva & Eddy, et Pauline D. Eddy, tu es le seul à avoir réussi à me faire lever à 5h du mat' en période de rédaction de thèse pour aller photographier chamois, lièvres et autres chevreuils, mais ça en valait la peine !

Ma petite Grignotte, tu as rendu ma rédaction de thèse beaucoup plus plaisante ! Tu as passé les longues heures de ma rédaction allongée, bien sagement (ou pas !) à côté de moi, à marcher sur le clavier quand tu en avais marre que je bosse. Merci ma p'tite boule de poils.

Merci à ma « petite » famille ! Tout d'abord, merci à mes parents pour leur soutien indéfectible ! Les mots me manquent pour décrire ce que je ressens. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager à réaliser mon rêve, vous y avez même cru pour moi quand je n'y croyais plus trop. Grâce à vous, j'ai passé quatre années à faire ce que j'aimais. Il s'est passé tellement de choses pendant ces quatre années... Merci donc à ma sœur et mes frères, Emilie-Olivier & Joseph, Pierre-Mélanie & Manon, Matthieu-Floriane & Lucas, François-Julie, et surtout à nos fabuleux parents, mais aussi nos fidèles bestioles, One, Apple, Gribouille, Fierté et Mirage. Un petit mot en particulier à François & Julie qui sont même venus en Allemagne me voir ! Merci Julie pour toutes tes relectures ! Et je finirai par vous dire qu'« on va passer pour des qu'on peut pas se permettre de passer pour ».

Enfin, merci à mes charmantes petites bêtes ! Malgré les nombreux dîners, je vous trouve très mignonnes et pleines de charme. Je suis un peu triste de vous quitter, l'air pataud de Cochylis et l'agitation permanente d'Eudémis me manqueront. Soyez sympa avec Karen, arrêtez de mourir au labo et accouplez-vous ! ;-)



Dessin de Camille Le Noène, à retrouver dans « Plume ! 17 »

## RESUME

Lors des interactions tri-trophiques impliquant une plante hôte, ses insectes phytophages et leurs ennemis naturels (parasitoïdes, prédateurs...), chaque niveau trophique est fortement dépendant des autres. La plante hôte peut influencer directement les traits d'histoire de vie des insectes phytophages et indirectement les ennemis naturels se développant aux dépens de ces insectes phytophages. Lorsque qu'un ennemi naturel comme un parasitoïde attaque l'insecte phytophage, son système immunitaire constitue sa dernière chance de survie. Une grande variation dans l'immunité des insectes est généralement observée dans les populations naturelles, suggérant que différentes pressions de sélection peuvent moduler et conduire à une adaptation des paramètres immunitaires. Ma thèse vise à déterminer les influences conjointes de la plante hôte et des parasitoïdes, sur les paramètres immunitaires des chenilles de deux ravageurs de la vigne, *Cochylis* (*Eupoecilia ambiguella*) et Eudémis (*Lobesia botrana*).

Durant ces trois années, nous avons mis en évidence une forte influence du cépage de vigne sur les effecteurs immunitaires des chenilles de vers de la grappe. De plus, le cépage de vigne semble être à l'origine d'un compromis entre les voies immunitaires constitutives et induites. La présence variable de bactéries à la surface des baies ne semble pas être à l'origine de ce compromis. Outre le cépage de vigne, nous avons démontré une forte action des parasitoïdes sur l'immunité des vers de la grappe. A l'échelle nationale, les populations d'Eudémis les plus immunocompétentes sont également les populations les plus parasitées. Cette corrélation positive entre le succès de parasitisme et les paramètres immunitaires des chenilles ne semble pas expliquée par une réponse plastique du système immunitaire des chenilles à la présence des parasitoïdes, mais plutôt par une sélection locale du système immunitaire, en réponse à la pression de parasitisme subie par ces chenilles sur plusieurs années.

Les différentes études réalisées dans le cadre de ma thèse confirment la complexité des relations tri-trophiques entre la plante hôte, l'insecte phytophage et ses ennemis naturels. L'intégration du système immunitaire de l'insecte phytophage semble primordiale dans la compréhension des interactions unissant ces trois protagonistes.

Mots clés : adaptation locale, cépage de vigne, compromis immunitaire, interactions tri-trophiques, plasticité phénotypique, succès de parasitisme, système immunitaire des insectes, Tordeuses de la vigne.

## ABSTRACT

In tritrophic interactions involving phytophagous insects, host plants and natural enemies, trophic levels are highly dependent on each other. Host plant may strongly affect directly phytophagous insect and indirectly natural enemies growing on these phytophagous insects. When a natural enemy attacks a phytophagous insect, the host immune system constitutes the last chance for the host to survive to an infection. A great variation of insect immune system is generally found in populations for susceptibility to pathogens, suggesting that variable selection pressures may have shaped and driven adaptation of immune traits. This project aims to determine the influence of both host plant and natural enemies on the larval immune system of grapevine moth pests, *Lobesia botrana* and *Eupoecilia ambiguella*.

During these three years, we have demonstrated a strong influence of grape variety on immune effectors of grapevine moth larvae. In addition, the grape variety modulates a trade-off between the constitutive and induced immune pathways. The variable presence of microbes on the surface of grape berries does not explain the trade-off in immune function. Beyond the grape variety effect, we also demonstrated a strong influence of parasitoids on the immune parameters of the grapevine moth larvae. In France, the most immunocompetent populations of grapevine moth are also the most parasitized. This positive correlation between successful parasitism and larval immune parameters seems not explained by a plastic response of the larval immune system to parasitoids presence, but rather by a local selection of larval immune system in response to parasitism pressure suffered by larvae for several years.

The different experiments realized in my thesis confirm the complexity of the tritrophic interactions between host plant, phytophagous insects and natural enemies. The integration of phytophagous insect immune system seems essential in understanding the interactions linking these three protagonists.

**Keywords:** immune trade-off, insect immune system, grape varieties, grapevine moth, local immune selection, phenotypic plasticity, successful parasitism, tritrophic interactions.

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                          |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Liste des tableaux .....                                                                                 | - 1 -  |
| Liste des figures .....                                                                                  | - 2 -  |
| Listes des annexes .....                                                                                 | - 3 -  |
| Introduction générale.....                                                                               | - 5 -  |
| I. Les interactions tri-trophiques.....                                                                  | - 6 -  |
| 1. La régulation des communautés.....                                                                    | - 7 -  |
| 2. Effets de la plante hôte sur les niveaux trophiques supérieurs .....                                  | - 9 -  |
| II. Les défenses des insectes phytophages .....                                                          | - 12 - |
| 1. Les défenses non immunologiques .....                                                                 | - 13 - |
| 2. Le système immunitaire des insectes .....                                                             | - 14 - |
| 3. Variation du système immunitaire, influence de la plante hôte.....                                    | - 17 - |
| III. Objectifs de l'étude .....                                                                          | - 20 - |
| Matériel & Méthodes générales .....                                                                      | - 25 - |
| I. Modèles biologiques .....                                                                             | - 26 - |
| 1. La vigne ( <i>Vitis vitifera</i> ).....                                                               | - 26 - |
| 2. Les Tordeuses de la vigne.....                                                                        | - 27 - |
| 3. Leurs ennemis naturels .....                                                                          | - 30 - |
| II. Méthodes générales .....                                                                             | - 31 - |
| 1. Conditions d'élevage et réalisation des diètes .....                                                  | - 31 - |
| 2. Évaluation de l'immunité.....                                                                         | - 33 - |
| 3. Évaluation de la qualité des chenilles .....                                                          | - 37 - |
| 4. Travail en populations naturelles .....                                                               | - 38 - |
| Chapitre I.....                                                                                          | - 43 - |
| I. Introduction.....                                                                                     | - 44 - |
| II. Le cépage de vigne et ses conséquences sur l'immunité des tordeuses de la vigne, en laboratoire..... | - 45 - |
| III. Le cépage de vigne influence-t-il également l'immunité des tordeuses, <i>in natura</i> ? .....      | - 46 - |
| Matériel et méthodes .....                                                                               | - 46 - |
| Résultats .....                                                                                          | - 47 - |
| IV. Discussion du chapitre.....                                                                          | - 50 - |
| Chapitre II .....                                                                                        | - 53 - |
| Chapitre III .....                                                                                       | - 57 - |
| Chapitre IV .....                                                                                        | - 61 - |
| Chapitre V .....                                                                                         | - 65 - |
| I. Introduction .....                                                                                    | - 66 - |
| II. Investissement dans les différentes barrières de défenses.....                                       | - 67 - |
| III. Test de choix des femelles parasitoïdes.....                                                        | - 68 - |
| Matériel et méthodes .....                                                                               | - 69 - |
| Résultats .....                                                                                          | - 70 - |
| IV. Discussion du chapitre.....                                                                          | - 71 - |

|                                                                                |         |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Discussion générale.....                                                       | - 75 -  |
| I. Les pressions de sélections modulant l'immunité des vers de la grappe ..... | - 77 -  |
| II. Implications de l'immunité dans la lutte biologique.....                   | - 85 -  |
| III. Conclusion .....                                                          | - 88 -  |
| Références bibliographiques .....                                              | - 89 -  |
| Annexes .....                                                                  | - 105 - |
| Annexe 1 .....                                                                 | - 106 - |
| Annexe 2 .....                                                                 | - 121 - |
| Annexe 3 .....                                                                 | - 138 - |
| Annexe 4 .....                                                                 | - 155 - |
| Annexe 5 .....                                                                 | - 182 - |
| Annexe 6 .....                                                                 | - 201 - |

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1:** *Tableau récapitulatif des études réalisées, depuis 10 ans, portant sur le potentiel effet de la plante hôte sur l'immunité des insectes phytophages.*

**Tableau 2:** *Influence du cépage de vigne sur la concentration en hémocytes, l'activité PO, l'activité PO-totale et l'activité antimicrobienne.*

**Tableau 3:** *Matrice de corrélations de Spearman pour les différents paramètres immunitaires : concentration en hémocytes, activités PO et PO-totale et activité antimicrobienne.*

**Tableau 4:** *Tableau récapitulatif des résultats obtenus par Cochylis et Eudémis pour les différentes mesures réalisées.*

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1 :** Schéma de la régulation des interactions entre les différents niveaux trophiques au sein d'une communauté, d'après Price et al. (1980).

**Figure 2 :** Variations (a) de la taille des pousses de la plante hôte (*Typha latifolia*) et (b) de taille des chrysalides du phytophage (*Nonagria typhae*) en fonction des années  $\pm$  les erreurs standards (d'après Tedder & Tammara 2002).

**Figure 3 :** Schéma récapitulatif de la réponse immunitaire d'une larve d'insecte après l'injection d'un œuf par une femelle parasitoïde.

**Figure 4 :** Surface de réponse montrant l'effet des protéines et des glucides consommés sur : (a) l'activité PO et (b) l'activité des lysozymes (d'après Cotter et al. 2011).

**Figure 5 :** Carte répertoriant les différents vignobles français (d'après vin-vin.com).

**Figure 6 :** Schéma du cycle de vie de l'Eudémis de la vigne (*Lobesia botrana*), d'après Thiéry (2005).

**Figure 7 :** Schéma de l'aire de répartition d'Eudémis (E) et Cochylis (C) dans les principales régions viticoles de France (d'après Sentenac 2010).

**Figure 8 :** Photographies (a) d'une chenille au 5<sup>ème</sup> stade larvaire et (b) d'une femelle adulte de Cochylis; ainsi que (c) d'une chenille au 5<sup>ème</sup> stade larvaire et (d) d'une femelle adulte d'Eudémis.

**Figure 9 :** Photographies des extrémités abdominales (a) d'une femelle et (b) d'un mâle Cochylis.

**Figure 10 :** Photographie des parasitoïdes femelles des Tordeuses de la vigne : (a) *Campoplex capitator*, (b) *Phytomyptera nigrina*, (c) *Diadegma fenestrata* (d) *Apanteles sicarius*.

**Figure 11 :** Photographie d'une cage d'accouplement d'Eudémis.

**Figure 12 :** (a) Cellule de Neubauer telle qu'utilisée avec (b) un zoom sur une partie de celle-ci contenant cinq hémocytes, suite à un prélèvement d'hémolymphe sur une chenille d'Eudémis.

**Figure 13 :** (a) Photographie d'une plaque ELISA après la mesure de l'activité PO (puits pairs) et totale (puits impairs); (b) Capture d'écran d'une courbe d'activité PO, catalysant la conversion de L-dopa en dopaquinone, d'un échantillon d'hémolymphe d'Eudémis (densité optique en fonction du temps) à partir de laquelle la concentration d'enzymes est estimée.

**Figure 14 :** (a) Photographie d'une boîte de Pétri présentant les tests classiques d'inhibition de croissance bactérienne de l'hémolymphe des différents individus testés (un puits par individu); (b) Photographie d'*Arthrobacter globiformis*.

**Figure 15 :** Photographie de la tête d'une chenille d'Eudémis au 5<sup>ème</sup> stade larvaire.

**Figure 16 :** Schéma récapitulatif des différentes régions de France échantillonnées lors des trois années de collectes.

**Figure 17 :** Photographie d'une chenille d'Eudémis au 5<sup>ème</sup> stade larvaire, dans un glomérule ouvert, le glomérule tissé de soie permettant à la chenille de se protéger lors de sa génération de printemps.

**Figure 18 :** Photographie d'une chenille de Cochylis au 5<sup>ème</sup> stade larvaire avec une blessure de parasitoïde (cercle rouge).

**Figure 19 :** (a) Concentration en hémocytes ( $\times 10^3$  haemocytes  $\mu\text{L}^{-1}$ ) dans l'hémolymphe des chenilles issues des différents cépages de vigne.

**Figure 20 :** Schéma de l'arène expérimentale utilisée pour la réalisation des tests de choix de la femelle *C. capitator*.

**Figure 21 :** (a) Pourcentage de temps passé par la femelle parasitoïde *C. capitator* du côté de Cochylis (E.a.) et Eudémis (L.b.). (b) Pourcentage de visites rendues par la femelle parasitoïde *C. capitator* à Cochylis (E.a.) et Eudémis (L.b.).

**Figure 22 :** Pourcentage de chenilles Cochylis (E.a.) ou Eudémis (L.b.) choisies par la femelle parasitoïde *C. capitator*.

**Figure 23 :** Graphiques représentant (a) la concentration en hémocytes, (b) l'activité PO-totale et (c) l'activité antimicrobienne dans l'hémolymphe des chenilles récoltées ainsi que le succès de parasitisme moyen en 2011 et 2012.

## LISTES DES ANNEXES

**Annexe 1:** Vogelweith, F., Thiéry, D., Moret, Y. & Moreau, J. 2013. Immunocompetence increases with larval body size in a phytophagous moth. *Physiological Entomology*, 38, 219-225.

**Annexe 2:** Vogelweith, F., Thiéry, D., Quaglietti, B., Moret, Y. & Moreau, J. (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology*, 25 (6), 1241-1247.

**Annexe 3:** Vogelweith, F., Thiéry, D., Moret, Y., & Moreau, J. Food-mediated modulation of immunity in a phytophagous insect: an effect of nutrition rather than parasitic contamination

**Annexe 4:** Vogelweith, F., Dourneau, M., Thiéry, D., Moret, Y. & Moreau, J. Geographical variation in parasite prevalence shapes larval immunity in the phytophagous European grapevine moth larvae, acceptée par *Naturwissenschaften*.

**Annexe 5:** Vogelweith, F., Moret, Y., Thiéry, D., Delbac, L. & Moreau, J. Which processes shape the grapevine moth immune response against parasitism?

**Annexe 6:** Vogelweith, F., Thiéry, D., Moret, Y., Colin, E., Motreuil, S. & Moreau, J. Defense strategies used by two sympatric moth pest of vineyards.



---

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## I. LES INTERACTIONS TRI-TROPHIQUES

Les écosystèmes, qu'ils soient terrestres ou aquatiques, sont caractérisés par une grande diversité d'espèces en interaction, dépendantes les unes des autres (Tscharntke and Hawkins 2002; Pearson and Dyer 2006). Ce sont ces interactions interspécifiques, telles que le mutualisme, la compétition ou la prédation, qui régissent les communautés<sup>1</sup>. Elles s'effectuent entre différents niveaux trophiques regroupant notamment les producteurs primaires (végétaux), les consommateurs primaires (phytophages), les consommateurs secondaires ou ennemis naturels (prédateurs, parasitoïdes...) et les consommateurs tertiaires ou super-prédateurs.

Les relations dites tri-trophiques entre une plante hôte, ses insectes phytophages et leurs ennemis naturels (prédateurs, parasitoïdes, virus...) sont un exemple de choix, de plus en plus étudié à l'heure actuelle de par leur importance, la curiosité qu'elles suscitent et les enjeux économiques qui les entourent. Dans ce système, chaque niveau trophique est influencé par les autres (Poppy 1997; Karimzadeh et al. 2004; Karimzadeh and Wright 2008) et les interactions complexes qui unissent ces trois protagonistes sont le fruit d'une fascinante coévolution où chaque niveau développe des adaptations pour survivre aux dépens de l'autre. Ainsi, la diversité spécifique des plantes hôtes et des ennemis naturels a des conséquences importantes sur les phytophages, notamment sur leur abondance (Aquilino et al. 2005). Les plantes hôtes peuvent également avoir des répercussions sur les traits d'histoire de vie des ennemis naturels et inversement (Aquilino et al. 2005). Pour ne donner qu'un exemple de ces interdépendances, Coley et ses collaborateurs (2006) ont montré chez plusieurs espèces de lépidoptères que la plante hôte affectait la croissance des chenilles mais aussi leurs traits défensifs (coloration, présence d'épines etc.) influençant ainsi leur sensibilité aux ennemis naturels. Le régime alimentaire des chenilles est alors façonné de manière à maximiser leur croissance et minimiser leur vulnérabilité face au troisième niveau trophique (Coley et al. 2006). Ces résultats suggèrent donc fortement que la taille des populations de phytophages est

---

<sup>1</sup> Une communauté est un assemblage de populations de différentes espèces qui coexistent au sein des écosystèmes dans l'espace et le temps (Danchin, Giraldeau & Cézilly 2008).

influencée par la diversité des communautés aux niveaux trophiques inférieurs et supérieurs (Aquilino et al. 2005).

## **1. La régulation des communautés**

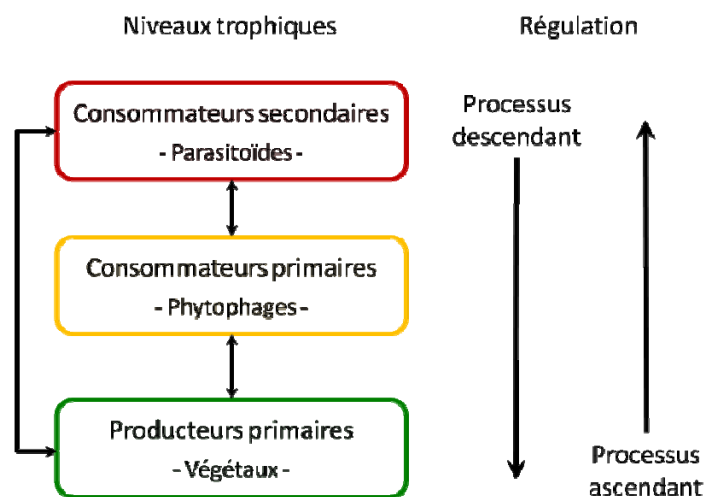
“Why do plants cover the earth and give the world a green appearance?” (Sabelis et al. 2002). Cette question posée par Sabelis et ses collaborateurs (2002) n’est pas si triviale qu’elle n’y paraît.

En 1960, Hairston et ses collaborateurs ont proposé une des premières hypothèses concernant la régulation des communautés de phytophages. Depuis la publication de ce travail fondateur, l’importance relative des niveaux trophiques sur l’abondance et la distribution des communautés a fait l’objet d’études intensives. Avec « the Green World Hypothesis », Hairston *et al.* (1960) ont avancé que les populations de phytophages seraient régulées par les prédateurs permettant aux plantes de prospérer et de donner cette couleur verte à la Terre. Cependant, ces auteurs négligeaient totalement la potentielle influence des plantes dans la régulation des phytophages. D’autres hypothèses ont ensuite été proposées en intégrant les plantes hôtes comme facteurs limitant les populations de phytophages. En effet, les plantes hôtes procurent les ressources essentielles à la survie, au développement... des insectes phytophages. Dans ce contexte, la diminution des ressources végétales entraînerait la réduction des autres niveaux trophiques (Hairston et al. 1960). C’est en 1980 que Price et ses collaborateurs ont intégré ces deux théories en proposant la notion d’interactions tri-trophiques où les plantes et les ennemis naturels réguleraient les populations de phytophages. Cette vision associe deux processus non mutuellement exclusifs : le processus ascendant « bottom-up regulation » et le processus descendant « top-down regulation » (Fig. 1) (Price and Hunter 2005; Dyer and Letourneau 1999; Miller 2008).

La régulation ascendante repose sur l’influence des producteurs primaires sur les niveaux trophiques supérieurs (Fig. 1) (Hairston et al. 1960). Ainsi, c’est la disponibilité des ressources nutritives qui contrôle les chaînes trophiques des producteurs jusqu’aux prédateurs. Lorsque la teigne des crucifères, *Plutella xylostella*, est élevée sur des plants de chou (*Brassica oleracea*) supplémentés avec différentes concentrations d’azote, la taille de la population de la teigne augmente avec la concentration en azote présente dans les plantes. Les populations de parasitoïdes *Diabrotica insulare* étant positivement corrélées avec la densité de la teigne des crucifères, il y aurait donc un effet favorable de la ressource végétale sur les

niveaux trophiques supérieurs (Fox et al. 1990; Fox and Mousseau 1996; Awmack and Leather 2002).

À l'inverse, le processus descendant propose que l'abondance des phytophages soit régie par la prédation impactant la dynamique des populations des niveaux trophiques inférieurs (Fig. 1) (Dyer and Letourneau 1999). Dans le cas des relations tri-trophiques, l'ennemi naturel aura donc un effet direct sur le phytophage ayant lui-même une action sur la plante hôte. Ceci a été parfaitement exposé par Gomez et Zamora (1994) à l'aide de l'interaction entre trois espèces de parasitoïdes (*Necremnus tidi*, *N. folia* et *Aprostocetus* sp.), une espèce de charançon (*Ceutorhynchus* sp.) et l'alysson épineux (*Hormathophylla spinosa*). Lors de cette étude, les auteurs ont démontré que le coléoptère réduisait la fécondité du crucifère. Lorsque les parasitoïdes sont présents, le pourcentage de fruits attaqués par le charançon diminue de moitié (Gomez and Zamora 1994) révélant l'importance des parasitoïdes pour les niveaux trophiques inférieurs.



**Figure 1 :** Schéma de la régulation des interactions entre les différents niveaux trophiques au sein d'une communauté, d'après Price et al. (1980). Les flèches représentent l'interdépendance des différents niveaux trophiques.

Il est maintenant largement accepté que les processus ascendants et descendants ne sont pas mutuellement exclusifs dans la dynamique des communautés, et que leur importance relative peut varier spatialement et temporellement (Hunter and Price 1992; Power 1992; Walker and Jones 2001; Lill et al. 2002). Toutefois, les auteurs admettent que la régulation ascendante a une plus grande influence, à long terme, que la régulation descendante (Coley et al. 2006; Walker et al. 2008).

## **2. Effets de la plante hôte sur les niveaux trophiques supérieurs**

L'étape suivante dans la compréhension de la régulation des populations de phytophages est d'expliquer les mécanismes qui permettent les interactions entre plantes hôtes, phytophages et ennemis naturels. Dans le cadre de la régulation ascendante, c'est la plante hôte qui est le centre de toutes les attentions. De nombreuses études ont déjà mis en évidence l'influence de la plante sur les traits d'histoire de vie des phytophages mais aussi sur ceux de leurs ennemis naturels (Price et al. 1980; Leather 1994; Ode 2006).

### **Effets directs de la qualité de la plante hôte sur les traits d'histoire de vie des phytophages**

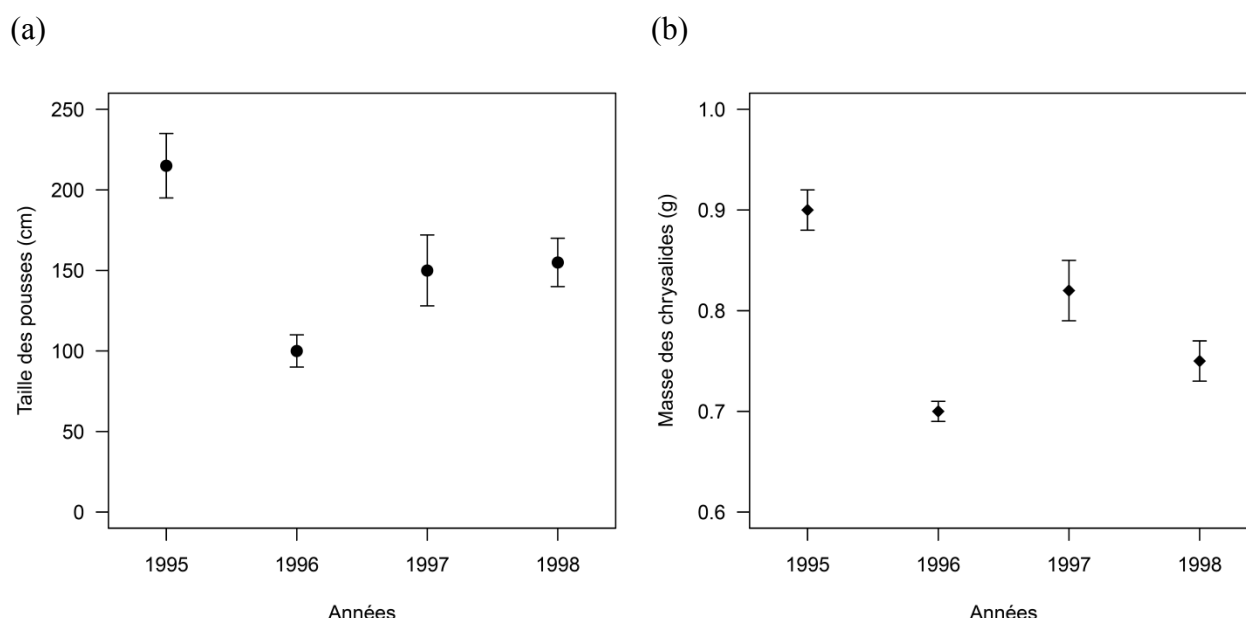
Au cours de sa vie, un phytophage est susceptible de rencontrer un large éventail de plantes hôtes dont la qualité nutritive<sup>2</sup> apparaît comme déterminante dans la stratégie d'exploitation des plantes hôtes (Awmack and Leather 2002). D'une manière générale, les études tendent à montrer que le développement d'un phytophage sur une plante hôte de moindre qualité nutritive affecte négativement sa survie (Kaspi et al. 2002; Di Giulio and Edwards 2003), sa taille adulte (Awmack and Leather 2002; Moreau et al. 2006a; Moreau et al. 2006c) et sa fécondité (Awmack and Leather 2002). Pour ne donner qu'un exemple synthétique parmi la multitude d'études sur ce sujet, le puceron du sycomore (*Drepanosiphum platanoides*) se nourrit exclusivement de la sève de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) (Dixon 1970). En début de saison, les composés azotés du phloème nécessaires à la croissance de la plante hôte sont présents en grande quantité. C'est également la période où les femelles phytophages sont nombreuses et très fécondes. En revanche, lorsque les feuilles de l'érable sycomore arrivent à maturation, les composés azotés du phloème diminuent et induisent directement une baisse de la reproduction des insectes. Puis, lorsque les feuilles entrent en sénescence, la disponibilité en azote croît à nouveau et la fécondité des phytophages ré-augmente elle aussi (Dixon 1970; Awmack and Leather 2002). La présence d'azote dans le phloème de la plante hôte est donc corrélée positivement avec la fécondité des phytophages. Ainsi, le potentiel reproductif du phytophage et plus globalement la taille de la population seront tributaires de la qualité de la plante hôte.

---

<sup>2</sup> La qualité de la plante hôte est reflétée par l'assemblage d'attributs chimiques tels que les composés primaires (carbone, azote...) et les métabolites secondaires défensifs, ou physiques (présence d'épines...) (Leather 1994 ; Awmack & Leather 2002).

## Effets indirects de la qualité de la plante hôte sur les traits d'histoire de vie des ennemis naturels

Étant donné l'impact de la plante hôte sur les phytophages, des répercussions sur les ennemis naturels via leurs hôtes semblent inéluctables. L'étude menée par Teder et Tammaru (2002) illustre bien la relation étroite entre ces trois niveaux trophiques. Les auteurs ont remarqué une variation annuelle de la vigueur<sup>3</sup> du roseau à massette, *Typha latifolia*. Au cours des quatre années de cette étude (de 1995 à 1998), une variation des conditions environnementales a été observée, avec une période de sécheresse en 1996. Cette même année, la taille des pousses du roseau a diminué de 1,2 mètre par rapport à l'année précédente, puis a atteint à nouveau une hauteur de 1,85 mètre en 1997 et 1998 (Fig. 2). De même, la masse des chrysalides de la Noctuelle de la massette (*Nonagria typhae*), ravageur de cette plante, a diminué de 70 % entre les années 1995 et 1996 avant de ré-augmenter fortement l'année suivante (Fig. 2). Les auteurs ont ensuite considéré le niveau trophique supérieur, les parasitoïdes de la Noctuelle, dont la masse a elle aussi augmenté de manière importante entre 1996 et 1997. Il apparaît donc clairement à travers cet exemple, que la variation de vigueur chez la plante hôte affecte non seulement les composantes biodémographiques des phytophages, mais aussi celles des ennemis naturels (Teder and Tammaru 2002).



**Figure 2 :** Variations (a) de la taille des pousses de la plante hôte (*Typha latifolia*) et (b) de la masse des chrysalides du phytophage (*Nonagria typhae*) en fonction des années  $\pm$  les erreurs standards (d'après Tedder & Tammaru 2002)

<sup>3</sup> La vigueur de la plante est définie, entre autres, par la taille des racines, la taille des jeunes pousses... (Tedder & Tammaru 2002).

Les répercussions des variations de la qualité de la plante hôte sur les niveaux trophiques supérieurs peuvent être expliquées par différents mécanismes. Parmi les plus courants, trois sont développés et illustrés ci-dessous.

En réponse aux multiples agressions subies par les phytophages, de nombreuses plantes ont développé un véritable arsenal chimique permettant de réduire leur consommation par les insectes phytophages. Ces produits allélochimiques (composés de défense des plantes) agissent soit en repoussant les insectes phytophages, soit par le biais de processus éco-physiologiques affectant leur développement, leur croissance et leur survie (Baldwin and Karban 1997). De nombreux phytophages se sont spécialisés et adaptés à la production de ces composés de défense chimiques (détoxification, séquestration...). Ils en ont ainsi tiré parti pour « construire » leurs propres défenses contre les ennemis naturels (Ode 2006; Gols and Harvey 2009). La chenille du lépidoptère, *Grammia geneura*, se nourrit sur différentes plantes hôtes toxiques contenant des alcaloïdes pyrrolizidines (Singer et al. 2004). Ces alcaloïdes pyrrolizidines sont séquestrés par la chenille malgré leurs effets négatifs sur la croissance du lépidoptère. Ainsi ils confèrent à la chenille une résistance envers ses parasitoïdes qui ne survivent pas à la toxicité des composés chimiques qu'elle séquestre de sa plante hôte (Singer et al. 2004).

La faible qualité nutritionnelle des plantes est souvent considérée comme un moyen de défense des plantes contre les insectes phytophages (Price et al. 1980). Pourtant, un phytophage se nourrissant d'une plante hôte de faible qualité nutritive tend à augmenter sa consommation de tissu pour compenser ce manque de nutriments (Lindroth et al. 1997). Ce trait défensif apparaît donc comme un paradoxe puisqu'en se défendant, la plante subit des dommages plus importants. Ce paradoxe fut levé par l'hypothèse « Slow-Growth High-Mortality » proposée par Clancy et Price (1987). Les auteurs suggèrent que les phytophages se développant sur une plante hôte de faible qualité ont un temps de développement plus long. Ainsi, ces individus seront exposés plus longtemps à leurs ennemis naturels et souffriront d'une plus forte mortalité. De nombreuses études se sont attachées à vérifier cette hypothèse. D'après Williams (1999), seulement 42% des études réalisées sur ce sujet approuvent cette hypothèse, 40% la rejettent et 18% ne trouvent pas de différence d'attaque entre les phytophages qui se développent lentement et ceux qui se développent rapidement. La généralisation de cette hypothèse demande donc de la prudence et ne peut s'appliquer pour tous les systèmes tri-trophiques (Williams 1999).

Lors de son « cri de détresse », ainsi appelé par Dicke & Balwin (2010), la plante produit des composés volatiles induits par les enzymes salivaires du phytophage, également appelés HIPVs (Herbivore-Induced Plant Volatiles) (voir la synthèse de Dicke & Baldwin 2010), attirant les ennemis naturels de ce dernier. Ces composés volatiles comprennent principalement des terpénoïdes, des dérivés d'acides gras, des benzénoïdes... (Dudareva et al. 2004). Leur émission n'est pas limitée à la zone attaquée mais se propage dans toute la plante et même aux plantes voisines permettant ainsi le recrutement d'un large éventail d'ennemis naturels (Turlings and Wackers 2004; Ode 2006). Le troisième niveau trophique peut alors être considéré comme faisant partie du panel de défenses d'une plante contre les phytophages (Price et al. 1980).

Au vu des nombreux travaux sur le sujet, il apparait, de manière unanime, que la variabilité de la qualité de la plante hôte influence directement les traits d'histoire de vie des phytophages mais aussi indirectement les ennemis naturels en affectant les capacités des phytophages à se défendre contre ces mêmes ennemis naturels. A l'heure actuelle, une hypothèse récemment proposée fait l'objet de recherches de plus en plus intenses. La plante hôte modulerait la résistance des phytophages aux ennemis naturels par une altération des défenses immunitaires (Ojala et al. 2005). Le système immunitaire est un des moyens de défense les plus efficaces contre les parasitoïdes (Smilanich et al. 2009), source principale de mortalité des insectes (Hawkins et al. 1997). Entre les quatre années qui séparent le début et la fin de mes travaux sur ce sujet, les études ciblant l'effet de la plante hôte sur le système immunitaire des phytophages n'ont cessé d'augmenter, passant de 6 à 17 en fin 2013 (Klemola et al. 2007; Klemola et al. 2008; Karimzadeh and Wright 2008; Bukovinszky et al. 2009; Alaux et al. 2010; Shikano et al. 2010; Smilanich et al. 2011b; Vogelweith et al. 2011; Cotter et al. 2011; del Campo et al. 2013) (voir toutes les études dans le Tab. 1).

## **II. LES DÉFENSES DES INSECTES PHYTOPHAGES**

Tout au long de son cycle de vie, de l'œuf, suivi de l'éclosion et jusqu'à la fin de sa vie adulte, un insecte phytophage fait face à de nombreux dangers, aussi bien d'origine abiotique (température, vent...) que biotique (ennemis naturels...).

## **1. Les défenses non immunologiques**

Les phytophages ont développé, au cours de leur histoire évolutive, tout un arsenal de défenses pour se protéger, en réponse aux pressions exercées par la guildes d'ennemis naturels dont ils sont la proie. Longtemps ignorées, les publications et synthèses ne cessent d'accroître nos connaissances sur ce sujet depuis les deux dernières décennies (voir les synthèses de Gross 1993, Parker *et al.* 2011 et Greeney, Dyer & Smilanich 2012). Ainsi, les phytophages n'utilisent pas uniquement leur système immunitaire pour se défendre mais également un ensemble de défenses définies par Park et ses collaborateurs (2011) comme « non immunologiques », incluant des défenses comportementales, morphologiques et chimiques (Greeney et al. 2012). Seuls quelques exemples seront développés par la suite.

Omniprésentes, diverses et souvent spectaculaires, les défenses comportementales sont les premières barrières employées contre les ennemis naturels (Greeney et al. 2012). Elles commencent par l'évitement spatial permettant de réduire les risques de rencontre avec les ennemis naturels jusqu'aux comportements d'évasion ou encore agressifs lors des rencontres (Greeney et al. 2012). Pour ne garder qu'un exemple, le débatement ou « twisting » est sans doute un des comportements les plus impressionnants. Par de violents mouvements, la chenille de la légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*) s'incurve, déséquilibrant la femelle parasitoïde qui ne peut injecter son œuf.

Les défenses morphologiques agissent dès que la rencontre entre l'ennemi naturel et l'insecte phytophage a eu lieu. Ainsi la coloration de l'insecte phytophage, la présence de poils urticants ou encore l'épaisseur de la peau sont tout autant de défenses permettant de réduire le succès d'une attaque (Greeney et al. 2012).

Si cette barrière de défense est également brisée, les défenses chimiques telles que la séquestration de composés secondaires, évoquée précédemment, peuvent également prendre le relais (Greeney et al. 2012). Souvent perçues comme peu coûteuses, ces différentes défenses le sont pourtant, à produire et à maintenir (Parker et al. 2011). Etant donné leur importance dans les interactions hôte-ennemis naturels, il est important de les considérer au même titre que les défenses immunitaires.

Ces barrières n'étant pas infaillibles, dès qu'un ennemi naturel a réussi à surpasser les premières barrières de défenses de son hôte, ce dernier doit alors produire une réponse rapide et efficace qui localise et neutralise le potentiel de croissance ou la capacité reproductrice de ce même pathogène (Siva-Jothy et al. 2005), le système immunitaire.

## **2. Le système immunitaire des insectes**

Le système immunitaire représente l'ensemble des processus biologiques qui protègent un organisme des maladies résultant des pathogènes et des cellules cancéreuses, en les identifiant et les éliminant. Sa fonction n'est pas seulement l'exclusion des parasites et la lutte contre les infections. Le système immunitaire permet de distinguer un large éventail d'agents infectieux en les différenciant des cellules saines et des tissus hôtes. Celui des invertébrés se distingue du système immunitaire des vertébrés car il ne possède pas de mémoire basée sur des immunoglobulines spécifiques et n'est pas discriminant face aux différents types de cellules du non-soi qu'il rencontre (Carton and Nappi 2001). En revanche, vertébrés et invertébrés possèdent une réponse immunitaire innée. Les mécanismes effecteurs de cette réponse immunitaire génèrent une réponse invariante selon les types d'infections, et ne sont pas altérés dans leur capacité de réponse aux infections ultérieures (Carton and Nappi 2001).

La réponse immunitaire des insectes est activée avec la reconnaissance d'un large spectre de motifs du non-soi provenant de molécules caractéristiques de la surface cellulaire des pathogènes, les « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs) reconnues par des « Pattern Recognition Peptides » (PRPs) (Fig. 3) (Siva-Jothy et al. 2005). Une fois le pathogène détecté, une suite de réponses systémiques, pouvant être classées selon deux types principaux, permet de combattre les infections : les réponses humorales et les réponses cellulaires. Les réponses humorales entraînent la production de peptides antimicrobiens, d'intermédiaires réactifs oxygénés ou azotés, et de composés intervenant dans le complexe de cascades enzymatiques qui régule la coagulation et la mélanisation de l'hémolymphe (Lavine and Strand 2002). Les réponses cellulaires reposent, quant à elles, sur les hémocytes (Lavine and Strand 2002).

Lors d'une infection, certaines défenses dites constitutives, sont omniprésentes et toujours prêtes à l'emploi (Siva-Jothy et al. 2005). Elles dépendent des hémocytes et de l'activation rapide de cascades enzymatiques dont celle du système prophénoloxydase (Marmaras and Lampropoulou ; Cerenius and Soderhall 2004; Siva-Jothy et al. 2005). Les hémocytes sont des cellules très nombreuses, de morphologies variables, circulant librement dans l'hémolymphe des insectes. Ils proviennent des tissus hématopoïétiques dans lesquels ils se divisent et se différencient. Ainsi, les hémocytes présentent différents types spécialisés dans des fonctions particulières de l'immunité, et dont le nombre varie en fonction du stade de

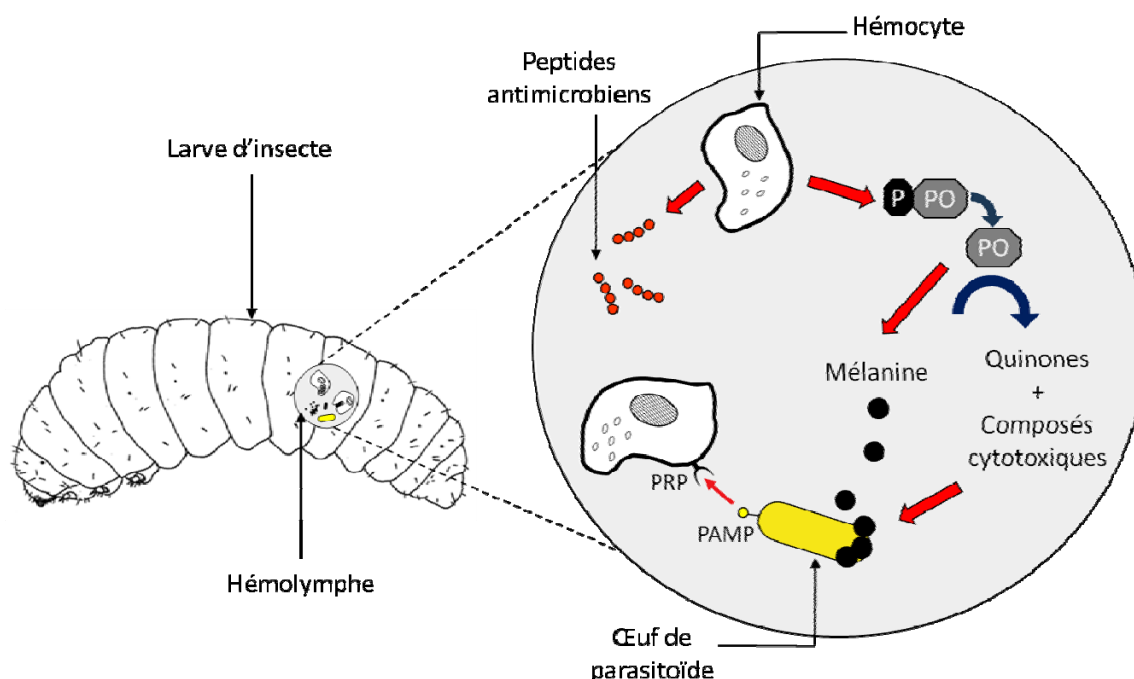
développement de l'individu et de son espèce (Lavine and Strand 2002; Siva-Jothy et al. 2005). Ils sont notamment impliqués dans la phagocytose<sup>4</sup> des corps étrangers, la nodulation<sup>5</sup> des bactéries et la coagulation de l'hémolymph suite à une blessure dans la cuticule (Lavine and Strand 2002; Siva-Jothy et al. 2005). Les hémocytes jouent également un rôle primordial dans la réaction d'encapsulation grâce à leur capacité d'agrégation et d'adhésion aux corps étrangers (Fig. 3) (Lavine and Strand 2002; Strand 2008; Falleiros et al. 2003). Pour cela, les hémocytes s'agrègent à la surface du corps étranger pour former plusieurs couches cellulaires. Cette agrégation d'hémocytes s'accompagne souvent d'un dépôt de mélanine à la surface du corps étranger, formant ainsi une capsule mélanique (Fig. 3) (Cerenius and Soderhall 2004; Siva-Jothy et al. 2005; Strand 2008). La synthèse de mélanine est assurée par l'enzyme phénoloxydase (PO) qui catalyse la production de quinones à partir de phénols. Les quinones polymérisent ensuite en mélanine à la surface du corps étranger, de manière non enzymatique. La PO est produite à partir de son précurseur inactif, la PPO, qui est stockée dans l'hémolymph et dans les hémocytes. La reconnaissance d'un corps étranger entraîne la libération rapide de la PPO qui est tout aussi rapidement activée pour produire de la mélanine. L'activité de la PO s'accompagne de la production de molécules cytotoxiques (quinones, phénols et, radicaux oxygénés et azotés) qui participent à la neutralisation des pathogènes (Fig. 3) (Nappi and Ottaviani 2000; Nappi and Vass 1998, 1993). En plus de la réaction de mélanisation, la PO est impliquée dans les processus de coagulation et de sclérotinisation<sup>6</sup> après une blessure, permettant de la refermer (Sugumaran et al. 2000).

---

<sup>4</sup> La phagocytose consiste en l'internalisation par les hémocytes de petites particules étrangères, ce qui conduira à leur dégradation (Ratcliffe & Rowley 1979).

<sup>5</sup> La nodulation est une micro-agrégation d'hémocytes autour de plusieurs microorganismes infectieux (bactéries...) (Ratcliffe & Gegen 1976).

<sup>6</sup> La sclérotinisation est le processus qui permet l'obtention d'une cuticule rigide chez les arthropodes, par l'action de composés chimiques.



**Figure 3 :** Schéma récapitulatif de la réponse immunitaire d'une larve d'insecte après l'injection d'un œuf par une femelle parasitoïde.

Suite à l'infection, un ensemble de peptides antimicrobiens (AMPs) est également produit et sécrété dans l'hémolymphe par les hémocytes (Fig. 3) (Lowenberger 2001), le corps gras et les épithéliums (Tzou et al. 2000). A l'heure actuelle, plus de 150 AMPs ont déjà été décrits et isolés chez les insectes avec des fonctions différentes telles que la neutralisation des bactéries Gram négatives pour les cecropines ou la destruction des bactéries Gram positives par les défensines (Tsakas and Marmaras 2010). Contrairement aux autres effecteurs, cette ligne de défense est plus spécifique et très efficace pour neutraliser les pathogènes bactériens. Cependant, sa mise en œuvre est relativement lente en raison du caractère inductible de cette voie immunitaire (Haine et al. 2008). Une fois stimulée, la production de peptides antimicrobiens peut être importante et durer relativement longtemps compte tenu de la durée de vie des invertébrés (Haine et al. 2008). La réponse immunitaire des insectes a donc une action humorale et cellulaire, immédiate grâce aux hémocytes et à la PO, et à long terme par l'intermédiaire des peptides antimicrobiens.

Avec cet arsenal de défense, les phytophages semblent bien équipés pour combattre les ennemis naturels qui les menacent. Pourtant, le nombre d'ennemis naturels montre que les insectes phytophages ne sont pas infaillibles. Ainsi, Otti et ses collaborateurs (2012) posent la question suivante : « Why do individuals have an imperfect immune system ? ». Bien que déterminée génétiquement (Cotter et al. 2004; Rolff et al. 2005), l'efficacité du système

immunitaire est également sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la densité de conspécifiques (Barnes and Siva-Jothy 2000) ou encore la quantité et la qualité de la nourriture ingérée (Lee et al. 2008; Schmid-Hempel 2003).

### **3. Variation du système immunitaire, influence de la plante hôte**

Au cours de sa vie, un phytophage va accumuler des ressources qu'il va devoir partager entre toutes ses fonctions vitales. La quantité de nourriture disponible étant limitée, l'investissement des phytophages dans la défense sera alors contrebalancé avec les autres traits d'histoire de vie, telle que la fécondité (Kraaijeveld et al. 2002). Il est alors inévitable que les ressources nutritives affectent la capacité des phytophages à répondre aux attaques des ennemis naturels. À court terme, Siva-Jothy et Thompson (2002) ont montré que la privation de nourriture affectait rapidement les fonctions immunitaires chez les ténébrions meuniers (*Tenebrio molitor*). En effet, le retrait de nourriture entraîne une diminution de l'activité PO du coléoptère. À l'inverse, dès que l'accès à la nourriture est rétabli, l'activité PO augmente à nouveau (Siva-Jothy and Thompson 2002). Cela montre, non seulement, que le maintien de l'immunité est coûteux mais également qu'il peut être modulé rapidement selon le statut nutritionnel des individus.

Grâce à cette étude réalisée en 2002, Siva-Jothy & Thompson ont posé les premières briques d'une hypothèse qui n'a fait que se développer depuis une décennie. Ainsi, plusieurs études ont maintenant testé l'influence de la nourriture et principalement de la plante hôte, sur la résistance des phytophages aux ennemis naturels via leurs défenses immunitaires (Tab. 1). Ainsi, Bukovinszky et ses collaborateurs (2009) ont mis en évidence l'impact de la qualité de l'alimentation sur la réponse immunitaire de la Piéride de la rave (*P. rapae*) face à un œuf de parasitoïde (*Cotesia glomerata*) (Tab. 1). Les auteurs ont démontré que les individus élevés sur des choux de Bruxelles (*B. oleracea gemmifera*), contenant peu de glucosinolates (composé de défenses des plantes), avaient un pourcentage d'encapsulation d'œufs de parasitoïde de 80% contre 60% pour les individus issus de choux contenant plus de glucosinolates (Bukovinszky et al. 2009). Chez la Noctuelle méditerranéenne (*Spodoptera littoralis*), un régime riche en protéines augmente la survie et le taux de croissance des larves à travers l'acquisition d'une meilleure activité antimicrobienne et d'une meilleure capacité de mélanisation (Lee et al. 2008) (Tab. 1). En revanche, les chenilles *Grammia incorrupta* qui se nourrissent de plantes hôtes composées de différents métabolites secondaires ou de diètes artificielles avec des concentrations de glucosides d'iridoïdes variables (IG ; composés de

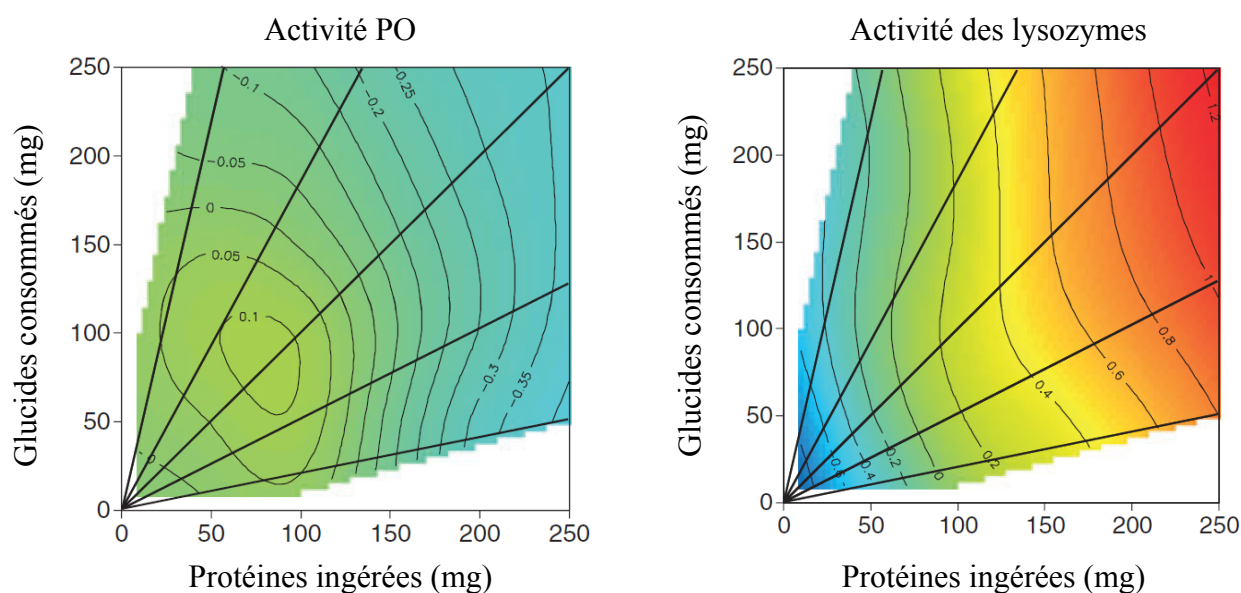
défenses des plantes), ne diffèrent pas dans leur capacité d'encapsulation de billes de Séphadex (Smilanich et al. 2011b) (Tab. 1).

**Tableau 1:** Tableau récapitulatif des études réalisées, depuis 10 ans, portant sur le potentiel effet de la plante hôte sur l'immunité des insectes phytophages. P correspond à Protéines et G, Glucides. Pour les mesures immunitaires, H correspond à la concentration en hémocytes ; AA, l'activité antimicrobienne ; AL, l'activité des lysozymes ; PO, l'activité PO ; EN, l'encapsulation ; M, la mélanisation et IB, l'infection bactérienne.

| Auteur                    | Espèce de phytophage         | Plantes hôtes ou diètes                                   | Mesures immunitaires |             |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|-------------|
|                           |                              |                                                           | Effet                | Pas d'effet |
| Ojala et al. 2005         | <i>Parasemia plantaginis</i> | ≠ composés secondaires                                    | EN                   | -           |
| Haviola et al. 2007       | <i>Epirrita autumnata</i>    | Groupes phénoliques de <i>Betula pubescens</i>            | EN                   | -           |
| Klemola et al. 2008       | <i>E. autumnata</i>          | ≠ qualité <i>Betula pubescens</i>                         | EN                   | -           |
| Karimzadeh & Wright 2008  | <i>Plutella xylostella</i>   | ≠ Brassicacées                                            | EN                   | PO          |
| Lee et al. 2008           | <i>S. littoralis</i>         | ≠ concentrations de P                                     | PO ; AA              | -           |
| Yang et al. 2008          | <i>E. autumnata</i>          | ≠ feuilles de 5 plantes hôtes                             | PO ; EN              | -           |
| Bukovinsky et al. 2009    | <i>Pieris rapae</i>          | ≠ Brassicacées                                            | EN                   | -           |
| Povey et al. 2009         | <i>S. exempta</i>            | ≠ ratio P:G                                               | PO ; AA ; IB         | -           |
| Shikano et al. 2010       | <i>Trichoplusia ni</i>       | <i>Brassica oleracea</i> & <i>Cucumis sativus</i>         | H ; IB               | PO          |
| Smilanich et al. 2009     | <i>Junonia coenia</i>        | <i>Plantago major</i> & <i>P. lanceolata</i>              | M                    | -           |
| Srygley et al. 2009       | <i>Anabrus simplex</i>       | P ou G                                                    | PO ; AL ; EN         | -           |
| Alaux et al. 2010         | <i>Apis mellifera</i>        | pollens : +/- P                                           | H                    | PO          |
| Diamond & Kingsolver 2010 | <i>Manduca sexta</i>         | <i>Nicotiana tabacum</i> & <i>Proboscidea louisianica</i> | M ; EN               |             |
| Cotter et al. 2011        | <i>S. littoralis</i>         | ≠ ratio P:G                                               | PO ; AL ; M          | -           |
| Smilanich et al. 2011b    | <i>Grammia incorrupta</i>    | ≠ concentrations IG                                       | -                    | M ; EN      |
| Richards et al. 2012      | <i>J. coenia</i>             | ≠ concentrations IG                                       | M                    | -           |
| Del Campo et al. 2013     | <i>M. sexta</i>              | Acide caféique +/-                                        | H ; IB               | PO          |

Un scénario est envisageable quant aux répercussions de la qualité de la plante hôte sur les niveaux trophiques supérieurs. Un phytophage élevé sur une plante de bonne qualité nutritive pourrait investir davantage dans les défenses immunitaires et donc mieux se défendre contre les ennemis naturels causant plus de dégâts aux plantes hôtes. À l'inverse, un phytophage élevé sur une plante de moindre qualité nutritive aura ses défenses immunitaires affectées négativement, il sera donc moins performant contre les ennemis naturels et causera moins de dégâts sur la plante hôte. De manière générale, la majorité des études s'accorde à montrer qu'une plante hôte de bonne qualité nutritive induit une activité PO plus importante, une meilleure encapsulation et une activité antimicrobienne plus forte (Lee et al. 2008; Bukovinszky et al. 2009; Diamond and Kingsolver 2011). Malgré l'importance incontestable de la nutrition sur les défenses immunitaires, un des défis dans les années à venir sera de comprendre la complexité de cette relation et ses conséquences sur les ennemis naturels.

L'influence de la plante hôte sur l'immunité des insectes phytophages est loin d'être aussi rudimentaire qu'un simple effet positif ou négatif sur l'immunité. En effet, une récente étude réalisée par Cotter et ses collaborateurs (2011), pointe cette complexité. Les auteurs ont montré que la nourriture ingérée par la Noctuelle méditerranéenne (*S. littoralis*) influençait différemment l'activité de l'enzyme PO et l'activité des lysozymes (Cotter et al. 2011) (Fig.4). L'activité des lysozymes semble maximale lorsque les chenilles ont un apport en protéines et en glucides important tandis que l'activité PO est peu affectée par le régime proposé (Fig. 4). Les deux traits immunitaires mesurés seraient donc régis par différents éléments nutritifs (Cotter et al. 2011).



**Figure 4 :** Surface de réponse montrant l'effet des protéines et des glucides consommés sur : (a) l'activité PO et (b) l'activité des lysozymes. Chaque chenille a été élevée individuellement sur une des 20 diètes variant par le pourcentage de protéines et le taux total de protéines et de glucides. Les lignes pleines indiquent les pourcentages de protéines limitées aux chenilles (17, 34, 50 et 67 ou 83%). L'échelle de couleur représente les écarts-types allant de la moyenne inférieure, en bleu, à la moyenne supérieure, en rouge. D'après Cotter et al. (2011).

Les études intégrant le système immunitaire dans les relations tri-trophiques pourraient également être profondément impliquées dans l'explication des relations tri-trophiques, notamment dans la modulation des choix d'utilisation des plantes hôtes par les phytophages (Smilanich et al. 2011a) ou encore dans les choix des ennemis naturels pour leur hôte phytophage. Cependant, la plupart des études réalisées ne considèrent qu'un paramètre immunitaire pouvant mener à des conclusions erronées (Adamo 2004). Seules quatre études (Povey et al. 2009; Srygley et al. 2009; Shikano et al. 2010; Cotter et al. 2011) se veulent réellement intégratives en considérant à la fois les différentes voies immunitaires, induites et constitutives, mais aussi une réponse à un challenge (encapsulation, mélanisation, infection bactérienne). De plus, aucune étude ne s'est attachée à regarder l'action conjointe des effets ascendants de la plante hôte et descendants des ennemis naturels, forces qui influencent toutes deux les traits d'histoire de vie des insectes phytophages. Etant donné l'importance de ces deux forces, des études intégratives, prenant différents paramètres du système immunitaire mais aussi les effets ascendants et descendants, sont nécessaires.

### III. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le but de ma thèse est d'étudier la modulation du système immunitaire d'un ravageur par les pressions de sélection que sont la plante hôte (effet ascendant) et les ennemis naturels

(effet descendant), en prenant l'exemple des interactions entre la vigne et ses différents cépages, les Tordeuses de la vigne, Eudémis (*Lobesia botrana*) et Cochylis (*Eupoecilia ambiguella*), et leurs principaux ennemis naturels, les parasitoïdes.

Les Tordeuses de la vigne sont un modèle d'étude idéal car des études antérieures ont montré que le cépage de vigne influençait directement les différents traits d'histoire de vie d'Eudémis (*Lobesia botrana*) (Moreau et al. 2006b; Moreau et al. 2006a; Moreau et al. 2006c; Moreau et al. 2007). En effet, selon le cépage de vigne où se développent les individus, la taille des œufs, la proportion d'œufs éclos et le taux de développement des chenilles sont très variables (Moreau et al. 2006b; Moreau et al. 2006a; Moreau et al. 2006c; Moreau et al. 2007). Les auteurs ont également montré que le taux de parasitisme des œufs d'Eudémis dépendait du cépage où s'étaient développés leurs parents (Moreau et al. 2009). De même, le succès de parasitisme des parasitoïdes larvaires d'Eudémis dépend du cépage sur lesquels les chenilles effectuent leur développement (Moreau et al. 2010). En accord avec les processus ascendants et descendants, l'hypothèse de base de mon travail de thèse est que le cépage de vigne et les parasitoïdes moduleraient le système immunitaire des Tordeuses de la vigne.

L'objectif du **premier chapitre** était de tester l'hypothèse d'une modulation du système immunitaire des vers de la grappe par le cépage de vigne, agissant ainsi sur leur capacité à se défendre contre les parasitoïdes. Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si des milieux nutritifs enrichis en baies de différents cépages de vigne influençaient les défenses immunitaires des chenilles de Tordeuses, en laboratoire. Dans un second temps, une campagne de terrain dans différents vignobles contenant plusieurs cépages de vigne a été réalisée afin de vérifier les résultats précédemment obtenus en laboratoire.

Lors du premier chapitre, un compromis entre les voies constitutives et induites du système immunitaire des vers de la grappe, modulé par le cépage de vigne, a été mis en évidence. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce compromis, notamment la présence de micro-organismes à la surface des baies de raisin. Le but de ce **deuxième chapitre** était de vérifier l'hypothèse selon laquelle les baies de raisin de certains cépages pourraient réduire/inhiber la croissance bactérienne à la surface et à l'intérieur du fruit. Ainsi, selon le cortège bactérien présent sur les baies de raisins, les chenilles investiraient différemment dans les voies constitutives et induites du système immunitaire.

Il a été démontré dans le premier chapitre que le cépage de vigne affectait l'immunité des vers de la grappe (régulation ascendante). Néanmoins, en population naturelle, les

chenilles sont soumises à de nombreuses pressions de sélection qui modulent également leurs moyens de défenses. Les ennemis naturels, et principalement les parasitoïdes, sont une des sources de mortalité majeure des insectes phytophages (régulation descendante). Ils pourraient donc exercer une forte pression de sélection sur le système immunitaire de leurs hôtes. L'objectif de ce **troisième chapitre** a consisté à mettre en évidence l'action conjointe des forces ascendantes (« bottom-up ») et descendantes (« top-down »), sur le système immunitaire d'Eudémis, *in natura*, dans les vignobles.

Ce troisième chapitre nous a permis de mettre en évidence l'action conjointe de la plante hôte et des ennemis naturels comme forces sélectives modulant les paramètres immunitaires des vers de la grappe. Ainsi, nous avons montré que les populations naturelles d'Eudémis les plus parasitées étaient également les populations où les paramètres immunitaires des chenilles étaient les plus fortement exprimés. Le but de ce **quatrième chapitre** était d'apporter une explication à cette corrélation positive entre immunocompétence et succès de parasitisme dans les populations naturelles d'Eudémis testées. Deux hypothèses ont été émises afin d'expliquer une telle relation. La première hypothèse implique une réponse plastique des chenilles qui élèveraient leur immunité suite à une détection précoce des parasitoïdes dans leur environnement. La seconde implique quant-à-elle une sélection des défenses immunitaires favorisant les chenilles les plus immunocompétentes après plusieurs années d'exposition aux parasitoïdes. Ainsi, des expériences visant à déterminer laquelle de ces deux hypothèses pourrait expliquer au mieux cette relation sont présentées.

Les chapitres précédents nous ont permis de mettre en évidence que les parasitoïdes exercent une force sélective très importante sur les traits d'histoire de vie des vers de la grappe. En réponse à ces agressions, les insectes ont développé un important arsenal de défenses comportant des barrières comportementales, morphologiques, physiologiques ou encore immunologiques. Les vers de la grappe, *Cochylis* (*Eupoecilia ambiguella*) et Eudémis (*Lobesia botrana*) sont deux des principaux ravageurs de la vigne en Europe vivant en sympatrie, partageant le même cortège parasitaire. L'objectif de ce **cinquième et dernier chapitre** était d'évaluer et comparer l'investissement de chacune des espèces dans les différentes barrières de défense afin de relier ces mesures au succès de parasitisme des parasitoïdes, en populations naturelles. Des tests de choix ont également été réalisés afin de voir si les parasitoïdes préféraient une des deux espèces, et de relier ce choix à l'investissement des chenilles dans les différentes barrières de défense.

Cette étude s'achèvera sur une discussion générale regroupant les principaux résultats obtenus sur les paramètres immunitaires des vers de la grappe et les pressions de sélection qui les modulent. Je discuterai également de l'apport de ces résultats dans un contexte appliqué, celui de la lutte biologique.



---

# MATERIEL & METHODES

## GENERALES

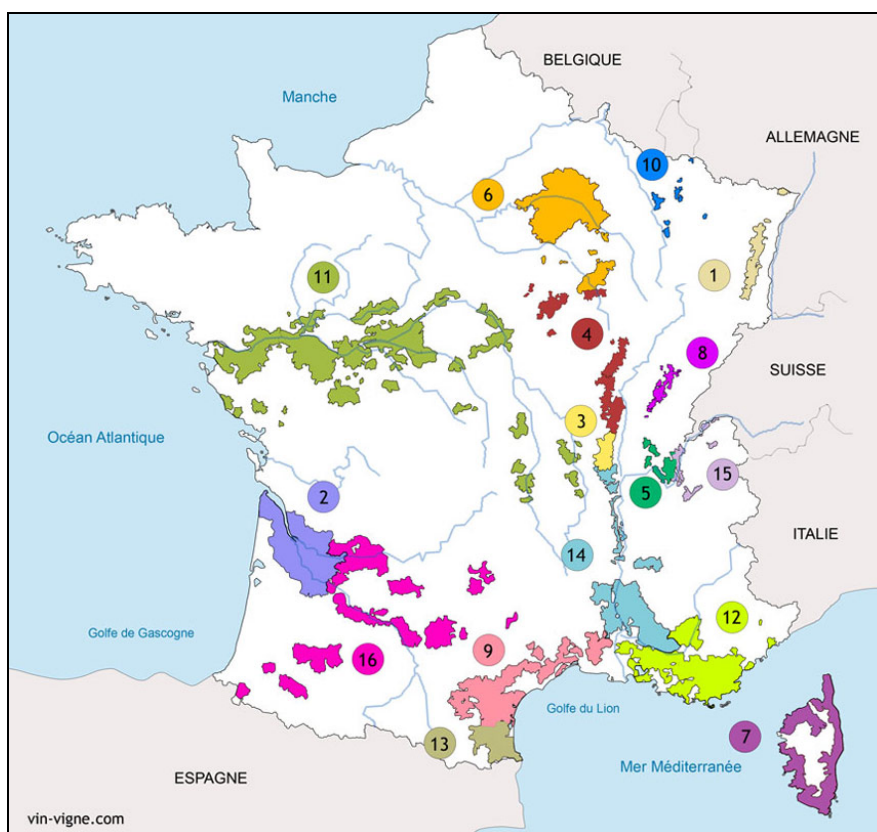
---

# MATERIEL ET METHODES GENERALES

## I. MODÈLES BIOLOGIQUES

### 1. La vigne (*Vitis vitifera*)

La vigne du genre *Vitis vinifera* (Vitales : Vitaceae) est une plante grimpante pérenne à croissance indéterminée. Elle est cultivée pour ses fruits charnus : les baies de raisins. Autrefois appelée Ampélidées, cette espèce est présente en Europe et Asie occidentale. Elle se subdivise en de nombreuses variétés, appelées cépages ou cultivars, issues de croisements naturels ou de sélections. En France, les vignobles couvrent 1,7% du territoire dans de nombreuses régions (Malnic 2004) (Fig. 5) et comptent plusieurs centaines de cépages dont 12 représentent plus de 70% des vignobles : Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Carignan, Chardonnay, Cinsault, Gamay, Grenache, Merlot, Pinot Noir, Sauvignon, Syrah et Ugni Blanc.



**Figure 5:** Carte répertoriant les différents vignobles français : (1) Alsace, (2) Bordeaux, (3) Beaujolais, (4) Bourgogne, (5) Bugey, (6) Champagne, (7) Corse, (8) Jura, (9) Languedoc, (10) Lorraine, (11) Loire, (12) Provence, (13) Roussillon, (14) Rhône, (15) Savoie, (16) Sud-Ouest (d'après vin-vin.com)

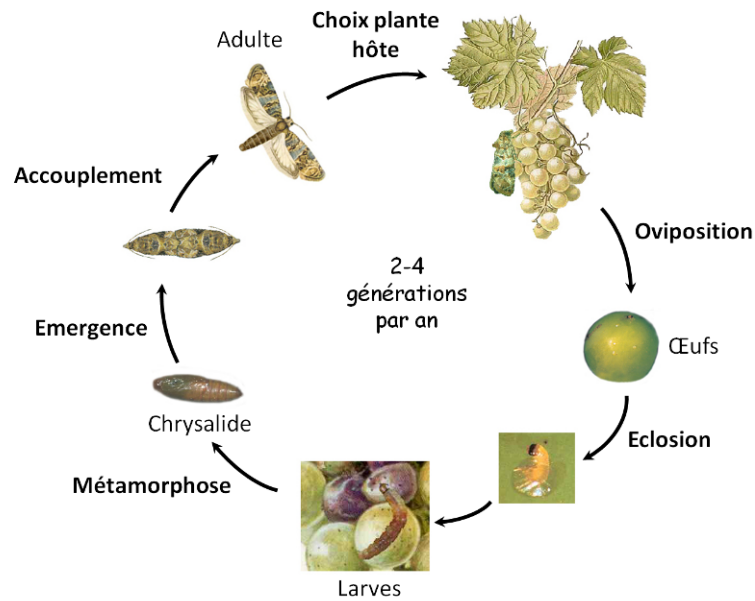
A l'image de toutes les grandes cultures, la vigne est la cible de multiples pathogènes qui causent d'importants dégâts. Parmi les plus fréquents, on compte des champignons tels que l'Oïdium (*Uncinula neactor*), le Mildiou (*Plasmopora viticola*) ou encore la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) (Thiéry 2008). De nombreux insectes apprécient également la vigne, notamment le sujet de cette thèse, les Tordeuses de la vigne.

## **2. Les Tordeuses de la vigne**

Sous ce nom original, « Tordeuses<sup>7</sup> de la vigne », également appelées « vers de la grappe », se cachent en réalité de redoutables petits Lépidoptères dont les chenilles dévorent sans vergogne les organes fructifères de la vigne. Parmi les quatre espèces de Tordeuses connues, *Cochylis* (*E. ambiguella* ; Lepidoptera : Tortricidae) (Hübner, 1796) et *Eudémis* (*L. botrana* ; Lepidoptera : Tortricidae) (Denis & Schiffermüller, 1775) font partie des principaux ravageurs de la vigne en raison de leur large aire de répartition et des dégâts qu'elles causent aux grappes (Thiéry 2008). Ce sont deux espèces polyvoltines qui effectuent entre deux et quatre générations par an selon la latitude à laquelle elles se développent en France (Fig. 6) (Thiéry 2005). La première génération d'œufs est généralement pondue en mai, puis les jeunes chenilles creusent des galeries et tissent un nid entre les boutons floraux formant un glomérule. La deuxième génération est pondue à la fin du mois de juin sur des baies immatures dans lesquelles elles se développent. Enfin, la troisième génération se développe entre mi-août et fin septembre sur des baies matures. Les populations naturelles sont polyphages, se nourrissant en majorité des cépages de vigne, source de nourriture très prévisible, mais également d'une trentaine de plantes hôtes alternatives (voir Thiéry 2008 pour la liste de leurs plantes hôtes). Les dégâts occasionnés par les chenilles peuvent, non seulement, altérer la qualité du vin, mais aussi faciliter le développement de pathogènes tels que la pourriture grise citée précédemment (Thiéry 2008).

---

<sup>7</sup> Les Tordeuses sont ainsi appelées en raison de leur particularité qui est d'enrouler ou de tordre, à l'aide de fils de soie, les feuilles des plantes dont elles s'alimentent (ici, la vigne).

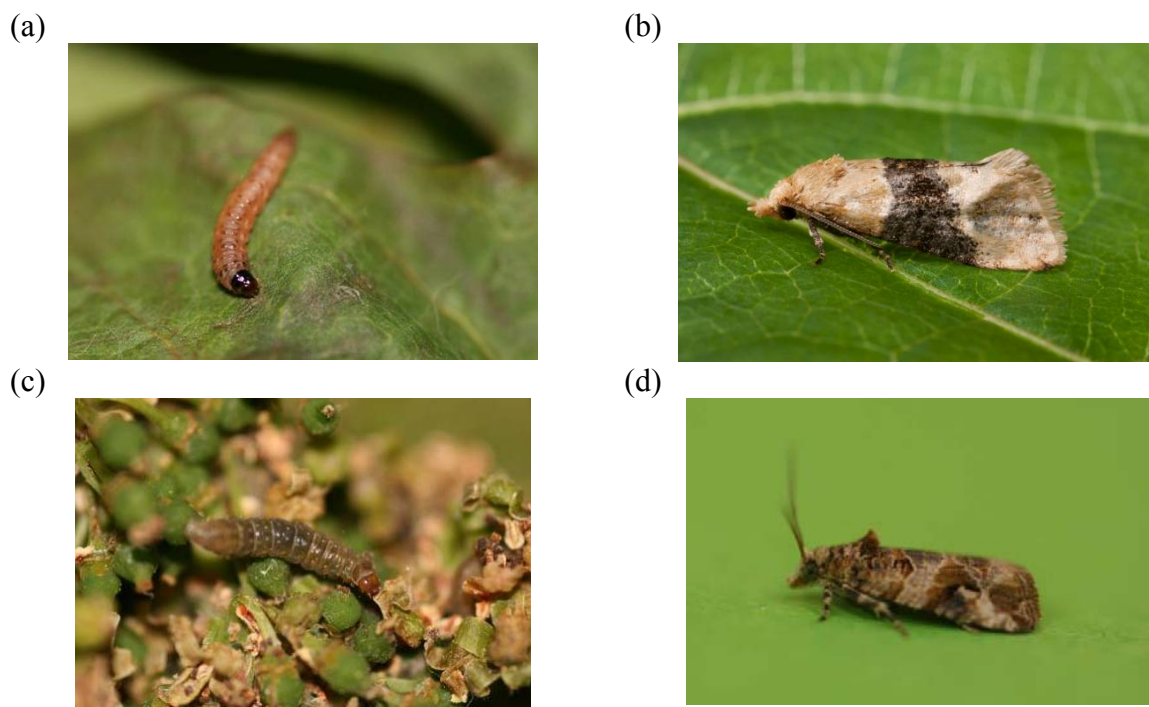


**Figure 6:** Schéma du cycle de vie d'*Eudemis* (*Lobesia botrana*) d'après Thiéry (2005).

Malgré une aire de répartition commune aux deux espèces, *Cochylis* (Fig. 7) préfère les zones plus froides et humides. Originaires d'Europe centrale, elles ont été décrites pour la première fois en 1796 (Thiéry 2008, 2005). Au début du XX<sup>e</sup> siècle, elles ravagent tout le vignoble français et plus particulièrement celui du Bordelais (Thiéry 2008). Leur aire de répartition géographique est très vaste, s'étendant de la Méditerranée jusqu'au sud de la Grande-Bretagne, mais également en Scandinavie, au Caucase, aux Balkans et en Chine (Charmillot et al. 1996). Les chenilles sont brun-orangé avec une capsule céphalique noire (Fig. 8a) tandis que les adultes sont beiges et arborent deux chevrons brun-noir sur les ailes (Fig. 8b).



**Figure 7:** Schéma de l'aire de répartition d'Eudemis (E) et Cochylis (C) dans les principales régions viticoles de France. Les lettres indiquent la présence de l'espèce. Les majuscles indiquent l'espèce prédominante (d'après Sentenac 2010).



**Figure 8:** Photographies (a) d'une chenille au 5<sup>ème</sup> stade larvaire (© F. Vogelweith) et (b) d'une femelle adulte de Cochylis (© P. Goetgeluck & D. Thiéry) ; ainsi que (c) d'une chenille au 5<sup>ème</sup> stade larvaire (© F. Vogelweith) et (d) d'une femelle adulte d'Eudemis (© F. Vogelweith). Les larves mesurent 1cm de long et les adultes entre 5 et 8 mm.

Eudémis est arrivée plus tardivement en Europe et préfère les régions chaudes et sèches telles que le pourtour de la Méditerranée. Les premiers dommages qu'elle a occasionnés sur les vignobles n'ont été recensés qu'au début du XX<sup>e</sup> siècle (Balachowsky and Mesnil 1935). Après son apparition dans les Alpes-Maritimes en 1890, elle colonise pratiquement tout le vignoble français en une vingtaine d'années (Thiéry 2008). Malgré son installation retardée par rapport à *Cochylis*, elle est actuellement la cause principale des dommages occasionnés sur les vignobles européens. Les chenilles sont de couleurs variables, allant du vert-transparent au bleu-transparent (Fig. 8c). Les adultes se distinguent aisément de *Cochylis*, par leur petite taille et leurs ailes gris-marbré à taches brunes plus foncées (Fig. 8d).

Chez les Tordeuses de la vigne, le mâle et la femelle possèdent les mêmes couleurs et sont de taille voisine. La différenciation se fait alors par l'examen de la partie postérieure de l'abdomen. L'extrémité ventrale de la femelle forme une sorte de gouttière par où sort l'organe de ponte, l'ovipositeur (Fig 9a). L'extrémité abdominale est généralement plus claire et plus fine chez le mâle, formant deux lèvres jointes garnies d'une pilosité importante (Fig 9b).



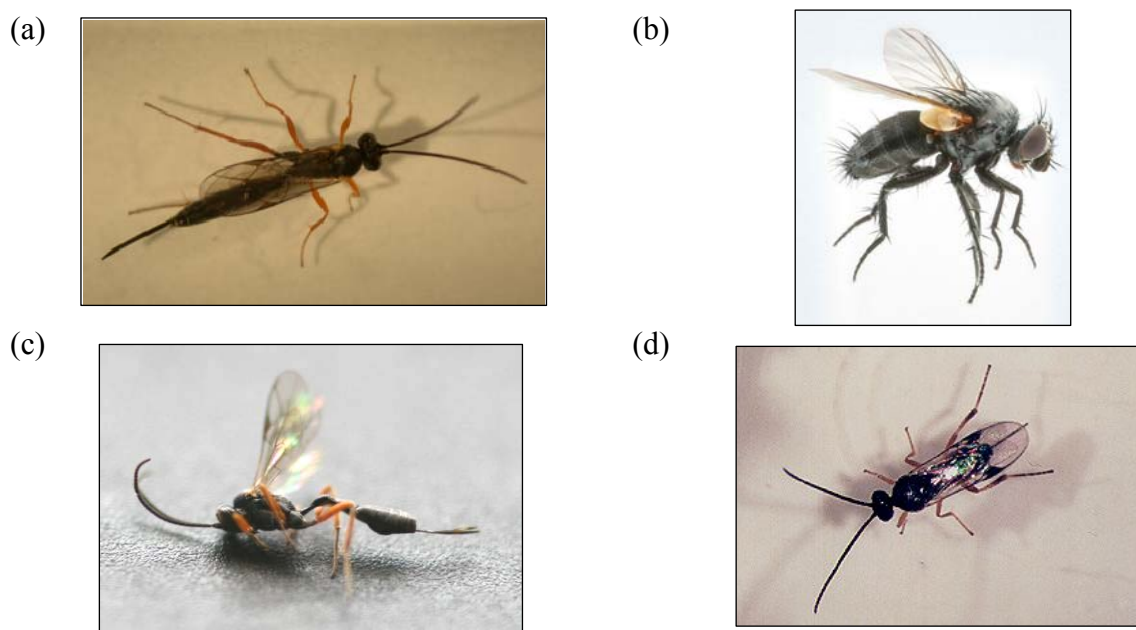
**Figure 9:** Photographies des extrémités abdominales (a) d'une femelle et (b) d'un mâle *Cochylis* (© D. Thiéry).

### 3. Leurs ennemis naturels

*Cochylis* et *Eudémis* sont les proies de nombreux ennemis naturels tels que les prédateurs (principalement *Chrysoperla carnea*), les parasitoïdes (principalement *Campoplex capitator*), les bactéries, les nématodes, etc.. Les parasitoïdes, et plus particulièrement les endo-parasitoïdes restent la source majeure de mortalité des phytophages (Hawkins et al. 1997).

À l'heure actuelle, très peu de choses sont connues sur les endo-parasitoïdes des Tordeuses de la vigne et seul un ouvrage recense et décrit certaines de ces espèces (Sentenac 2011). Plus de 80% des endo-parasitoïdes sont des Hyménoptères de la famille des Ichneumonidae suivis par des Diptères de la famille des Tachinidae. Ces endo-parasitoïdes larvaires s'attaquent aux premières et deuxième générations de Tordeuses. Parmi les plus

fréquentes, on rencontre *Campoplex capitator* (Aubert, 1960 ; Hymenoptera : Ichneumonidae) (Fig. 10a) dont le parasitisme peut atteindre 100% dans certains vignobles bordelais (Thiéry 2008), *Phytomyptera nigrina* (Meigen, 1824 ; Diptera : Tachinidae) (Fig. 10b), *Diadegma fenestrale* (Holmgren, 1860 ; Hymenoptera : Ichneumonidae) (Fig. 10c), *Apanteles sicarius* (Marshall, 1885 ; Hymenoptera : Braconidae) (Fig. 10d) et *Exochus notatus* (Holmgren, 1858 ; Hymenoptera : Ichneumonidae). Ces cinq espèces de parasitoïdes ont été recensées lors de nos trois campagnes de terrain, dans différentes régions viticoles de France (voir toutes les espèces recensées dans Thiéry 2008; Sentenac 2011).



**Figure 10:** Photographies des parasitoïdes femelles des Tordeuses de la vigne : (a) *Campoplex capitator* (© D. Thiéry), (b) *Phytomyptera nigrina* (© W. Gritsch), (c) *Diadegma fenestrale* (© F. Vogelweith) (d) *Apanteles sicarius* (© D. Thiéry).

## II. METHODES GENERALES

### 1. Conditions d'élevage et réalisation des diètes

Les insectes testés lors de mes études proviennent de l'élevage de l'INRA de Bordeaux (UMR santé Végétale). Les Cochylys sont issues d'une lignée fournie par « Staatliches Weinbauinstitut Freiburg », maintenue depuis plusieurs générations à l'INRA de Bordeaux. Les Eudémis étudiées descendent d'individus collectés dans un vignoble de Sauternes (Aquitaine, France) et maintenus depuis plusieurs générations à l'INRA de Bordeaux. Les adultes sont groupés en grand nombre dans une cage d'accouplement et de ponte afin de favoriser la panmixie (Fig. 11). Chaque espèce est maintenue dans des

conditions standards ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  ;  $70 \pm 10\%$  d'humidité ; photopériode : 16 h de jour et 8 h de nuit). La ponte des femelles (environ 70-80 œufs par femelle fécondée issue de l'élevage) est récoltée sur des supports en papier lisse, surface qu'elles affectionnent pour pondre leurs œufs. Les papiers de ponte sont ensuite retirés de la cage d'élevage et placés dans des bacs (18 x 11.5 x 7 cm) sur une diète semi-artificielle disponible *ad libitum* (voir composition ci-dessous).



**Figure 11:** Photographie d'une cage d'accouplement d'*Eudemis* (© D. Thiéry)

### Réalisation des diètes artificielles

La diète semi-artificielle utilisée pour l'élevage est composée de : 1000 ml d'eau, 15 g d'agar, 84,63 g de farine de maïs, 41,25 g de germe de blé, 45,48 g de levure, 6,03 g d'acide ascorbique, 0,32 g de Scala®, 3,35 g de sels Wesson, 5 ml d'éthanol dilué à 0.5%, 2,65 g d'acide benzoïque et 2.76 g de Nipagine. Cette diète est également utilisée comme diète contrôle pour toutes les expériences réalisées en laboratoire.

Les diètes enrichies en baies de raisin sont réalisées sur cette même base mais avec seulement 20% de farine de maïs et de germe de blé. Les 80% manquants ont été remplacés par un équivalent de 30 g de poudre de raisin lyophilisé. Les poudres de baies sont obtenues à partir de baies récoltées l'été précédant l'expérience. Les différents cépages sont issus de la collection de cépages de l'INRA de Bordeaux (Centre de recherches de Bordeaux, La Grande Ferrade). Tous les cépages sont cultivés sur un terroir homogène. La parcelle étant de surface limitée, on estime qu'ils reçoivent les mêmes conditions climatiques. Les grappes sont récoltées manuellement aux stades inflorescence (correspondant à la première génération de chenilles), pré-véraison (stade de changement de couleur de la baie, correspondant à la deuxième génération) ou baies mures (correspondant à la troisième génération), entre 14h et 17h, puis immédiatement congelées à  $-18^\circ\text{C}$ . Les grappes n'ont pas reçu de traitement insecticide.

Pour les stades pré-véraison et baies matures, les pépins sont retirés des baies congelées en raison de leur toxicité potentielle (Moreau et al. 2006a). Les baies sont alors placées dans des boîtes de Pétri pour être déshydratées dans un lyophilisateur à vide (Christ Alpha 1-4 LD Plus) pendant 16 h. Les baies séchées sont ensuite réduites en poudre très fine à l'aide d'un broyeur (Waring Laboratory Two-Speed Blenders). La diète est réalisée dans une soupière stérile et coulée à chaud dans des micro-tubes de centrifugation de 1.5 ml. Le couvercle de chaque micro-tube ayant été préalablement percé de plusieurs trous à l'aide d'une seringue afin de permettre une circulation d'air. Une fois la diète refroidie (environ 24 h à température ambiante), celle-ci est scarifiée avant le dépôt des larves afin de faciliter leur installation. La quantité de nourriture présente dans le tube est suffisante pour la considérer comme disponible *ad libitum* (Thiery and Moreau 2005). Les chenilles âgées de moins de 12 h sont ensuite déposées sur les différentes diètes à l'aide d'un pinceau fin.

## **2. Évaluation de l'immunité**

L'évaluation de l'immunité des chenilles de Tordeuses de la vigne s'effectue via la mesure du niveau de base de trois paramètres immunitaires clés : la concentration en hémocytes, l'activité du système PO-PPO et l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe. Souvent, le niveau basal des défenses immunitaires n'est pas suffisant pour caractériser l'immunocompétence des animaux (Adamo 2004). La capacité à mobiliser ces défenses lors d'une infection est une indication complémentaire primordiale pour estimer la capacité d'un individu à survivre dans un environnement pathogénique. Un challenge immunitaire par exposition à une infection microbienne de 24 h a donc été réalisé dans certaines expériences, lorsqu'il était possible.

### **Prélèvement d'hémolymphe**

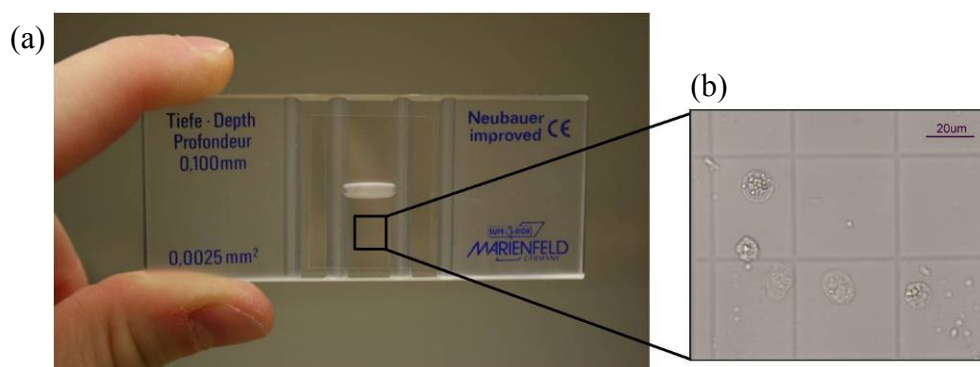
Un seul prélèvement d'hémolymphe est nécessaire pour toutes les mesures du système immunitaire. Afin de procéder au prélèvement d'hémolymphe, les chenilles, aux premiers jours du dernier stade larvaire (stade L5), sont anesthésiées en plaçant leur tube d'élevage dans de la glace pendant 20 min. La chenille est ensuite retirée avec soin du tube et la partie postérieure de l'abdomen de la larve est piquée à l'aide d'une seringue à insuline (Terumo), laissant apparaître une goutte d'hémolymphe.

Trois microlitres de cette goutte d'hémolymphe sont collectés à l'aide d'un capillaire en verre (Hirsmann®Laborgeräte). Deux microlitres sont déposés dans un micro-tube de

centrifugation de 0.5 ml contenant 2  $\mu$ l de Sodium Cacodylate (NaCac) (0.01M cacodylate de sodium ; 0.005M  $\text{CaCl}_2$  ; pH 6.5) permettant de mesurer l'activité antimicrobienne. Ces tubes ont préalablement été traités avec du Phénylthiourée (PTU), permettant d'inhiber l'activité PO. Le microlitre d'hémolymph restant dans le capillaire est déposé dans un autre micro-tube contenant 20  $\mu$ l de NaCac afin de mesurer la concentration en hémocytes et l'activité du système PO-PPO. Les micro-tubes de centrifugation sont ensuite stockés au congélateur à  $-27^\circ\text{C}$  avant de mesurer les différents paramètres immunitaires. Seule la concentration en hémocytes est mesurée immédiatement.

### Mesure de la concentration en hémocytes

Après le prélèvement d'hémolymph, 10  $\mu$ l de l'échantillon sont immédiatement déposés sur une cellule de Neubauer pour y mesurer la concentration de l'ensemble des hémocytes à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Nikon éclipse E200) (Fig. 12). La concentration en hémocytes est exprimée en nombre d'hémocytes présents dans 1  $\mu$ l d'hémolymph.

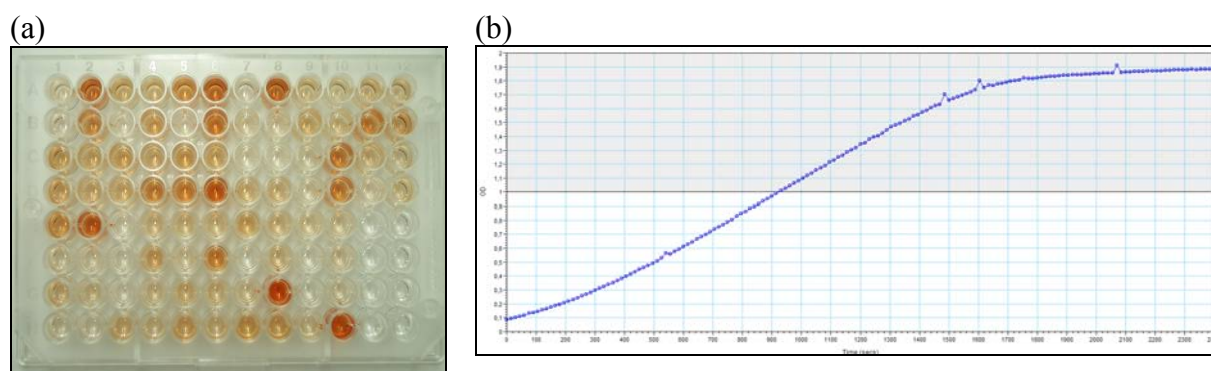


**Figure 12:** (a) Cellule de Neubauer telle qu'utilisée avec (b) un zoom sur une partie de celle-ci contenant cinq hémocytes, suite à un prélèvement d'hémolymph sur une chenille d'Eudémis (© F. Vogelweith).

### Mesure de l'activité enzymatique du système PO-PPO

Les activités enzymatiques du système PO-PPO sont mesurées par spectrophotométrie. Les échantillons sont décongelés sur de la glace puis centrifugés à  $4^\circ\text{C}$  pendant 5 min à 5000 rpm. Pour mesurer la fraction d'enzymes naturellement active (activité PO), 5  $\mu$ l de l'échantillon sont déposés dans un mélange composé de 140  $\mu$ l d'eau distillée et de 20  $\mu$ l de PBS (8,74 g NaCl ; 1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; 1000 ml d'eau distillée ; pH 6,5). La fraction totale d'enzymes (activité PO-totale : PO + PPO) est mesurée après activation avec de la chymotrypsine (Sigma C 7762 – 0,07 mg/ml d'eau distillée) de toutes les enzymes inactives (Cornet et al. 2009; Marmaras and Lampropoulou 2009) (Fig. 13). Ensuite, 20  $\mu$ l d'une

solution de L-Dopa (Sigma D 9628 – 4 mg/ml d'eau distillée, passée au bac à ultrasons) ont été ajoutés dans chaque puits de la microplaque (Cornet et al. 2009). La réaction de conversion de la L-DOPA en dopachrome est suivie à 490 nm pendant 40 min dans un spectrophotomètre (Versamax), à 30°C. Les lectures ont été prises toutes les 15 s avec agitation automatique avant chaque prise de mesure. Les courbes de réaction sont analysées à l'aide d'un logiciel SoftMax®Pro 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Les activités enzymatiques ( $V_{\max}$  en milliunités/minute) sont déduites de la pente de la courbe de réaction durant sa phase linéaire et rapportées à l'activité enzymatique d'1  $\mu$ l d'hémolymphe pure. Les deux niveaux d'activités (activité PO et activité PO-totale) sont mesurés sur le même échantillon.



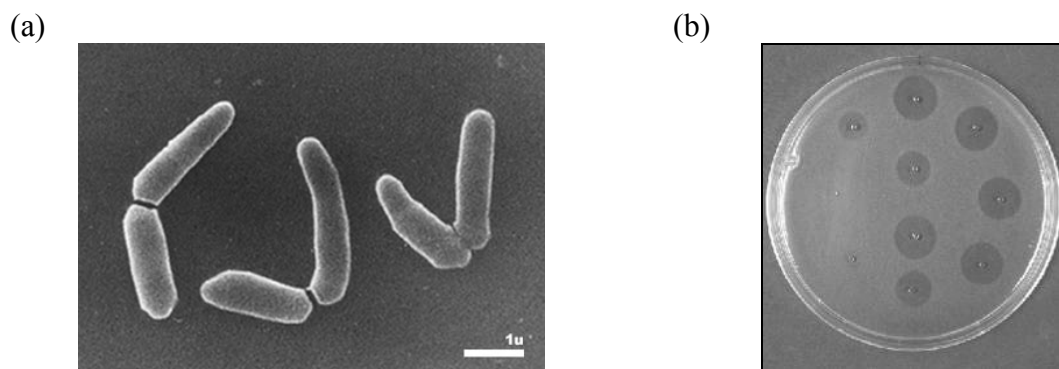
**Figure 13:** (a) Photographie d'une plaque ELISA après la mesure de l'activité PO (puits pairs) et PO-totale (puits impairs) (© Y. Moret). Les variations de couleur sont dues aux différentes concentrations de dopaquinone qui sont corrélées aux concentrations d'enzymes (PO et PPO) dans l'hémolymphe des chenilles testées ; (b) Capture d'écran d'une courbe d'activité PO, catalysant la conversion de L-dopa en dopaquinone, d'un échantillon d'hémolymphe d'Eudémis (densité optique en fonction du temps) à partir de laquelle la concentration d'enzymes est estimée (© F. Vogelweith).

### Mesure de l'activité antimicrobienne

La mesure de l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe s'effectue via l'évaluation du pouvoir inhibiteur de la croissance du bactérium *Arthobacter globiformis* (Fig. 14a) par l'hémolymphe.

Des boîtes de Pétri (diamètre 9 cm ; Sterlin) sont préparées par ajout d'une suspension de bactérie *A. globiformis* (Collection Institut Pasteur, CIP 105365) à 6 ml de milieu LB stérile (10 g bactotrypone ; 5 g extrait de levure ; 10 g NaCl ; 1000 ml d'eau distillée ; pH 7,5), avec 1% de bacto-agar à 45°C de manière à obtenir une concentration de  $1 \times 10^5$  bactérie/ml. Les boîtes de Pétri sont agitées afin de disperser les bactéries sur toute la surface de la boîte. Une fois l'agar solidifié, quatorze puits (diamètre 2 mm) sont réalisés sur chaque boîte de Pétri à l'aide d'une micropipette Pasteur stérilisée avec un bec Bunsen.

Les échantillons de 2  $\mu$ l d'hémolymphe décongelés sont ensuite déposés dans les puits. Sur chaque boîte, un puits est réservé pour le contrôle positif, une solution de tétracycline de 0,03 mg/ml. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 48 h dans une étuve sèche à 30°C. Pendant ce temps, les substances antimicrobiennes contenues dans l'hémolymphe inhibent la croissance d'*A. globiformis* entraînant la formation d'une zone circulaire libérée de toute bactérie autour du puits, dont le diamètre est proportionnel à la force d'inhibition des peptides antimicrobiens (Fig. 14b). En revanche, l'espace entourant ces zones est turbide en raison de la croissance des bactéries. Le diamètre moyen de chacune des zones d'inhibition est calculé en mesurant son diamètre maximum et minimum. Le témoin a été mesuré de la même manière et permet de corriger chacune des valeurs en tenant compte de l'effet de la boîte de Pétri sur laquelle ont été déposés les échantillons.



**Figure 14:** (a) Photographie d'*Arthrobacter globiformis* (©T. Tamura, T. Nishii & K. Hatano) ; (b) Photographie d'une boîte de Pétri présentant les tests classiques d'inhibition de croissance bactérienne de l'hémolymphe des différents individus testés (un puits par individu) (© Y. Moret).

### Mesure de la réponse à une stimulation immunitaire

Afin de tester l'amplitude de la réponse du système immunitaire suite à une infection, des individus ont subi une stimulation immunitaire à l'aide de bactéries. À la différence du prélèvement classique d'hémolymphe exposé précédemment, seulement 1  $\mu$ l d'hémolymphe est prélevé. Ce prélèvement est effectué à l'aide d'une minutie préalablement trempée dans un culot de bactéries *A. globiformis* inactivées par la chaleur (100°C pendant 5 min). Lors de la piqûre, une goutte d'hémolymphe d'1  $\mu$ l est collectée afin de mesurer la concentration des hémocytes et l'activité du système PO-PPO. Les larves sont ensuite replacées dans leurs tubes d'élevage pendant 24 h avant qu'un nouveau prélèvement d'1  $\mu$ l hémolymphe ne soit effectué pour mesurer à nouveau les paramètres immunitaires cités précédemment. Une différence entre ces deux mesures (avant et après stimulation) a ainsi été obtenue pour chaque paramètre immunitaire.

### 3. Évaluation de la qualité des chenilles

#### Le temps de développement

Le temps de développement entre le dépôt des chenilles sur le milieu nutritif et le premier jour du cinquième stade larvaire est pris en compte dans chacune des études réalisées en laboratoire. Il permet d'avoir un indice de la valeur nutritive de la diète. En effet, la diète contrôle nous indique le temps de développement lorsque les larves sont dans des conditions idéales.

#### La taille – Annexe 1

Pour chaque larve testée, un indice de taille est déterminé par l'intermédiaire de la mesure de la taille de la capsule céphalique, représentative du stade larvaire (Thiéry 2005; Delbac et al. 2010) (Fig. 15). Cette méthode, couramment utilisée chez les Lépidoptères, permet de catégoriser les stades larvaires. Elle est plus fiable que la mesure du poids qui fluctue de manière beaucoup plus importante au sein d'un stade larvaire (Godin et al. 2002; Delbac et al. 2010; Panzavolta 2007). La capsule céphalique est mesurée à l'aide d'une loupe binoculaire (NIKON SMZ-10A) et d'un vidéo mesureur (LINKAM VTO 232). Seuls les individus ayant une capsule céphalique supérieure à 1 mm (Thiéry 2005), correspondant au cinquième stade larvaire (L5), sont utilisés pour nos expériences. Ce critère de sélection a été déterminé par des expériences préliminaires qui ont montré que seules les larves au cinquième stade larvaire disposaient d'une quantité d'hémolymphe suffisante nous permettant de réaliser les différentes mesures immunitaires sur un même individu.



**Figure 15:** Photographie de la tête d'une chenille d'Eudémis au 5<sup>ème</sup> stade larvaire (© F. Vogelweith). La flèche rouge représente la mesure effectuée pour évaluer la taille de la capsule céphalique de la larve.

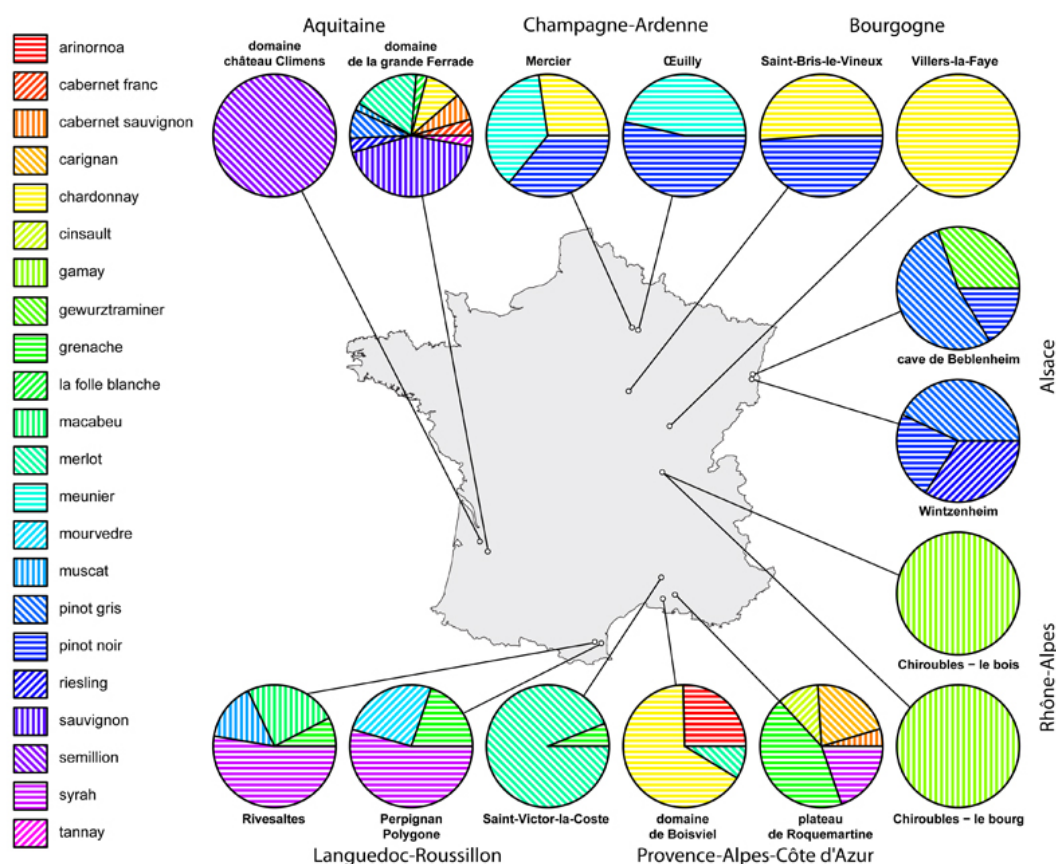
**Annexe 1** – Vogelweith, F., Thiéry, D., Moret, Y. & Moreau, J. 2013. Immunocompetence increases with larval body size in a phytophagous moth. *Physiological Entomology*, **38**, 219-225.

La taille de la capsule céphalique est un indicateur fiable de la taille et du stade larvaire des individus. Cependant, au sein d'un même stade larvaire, les individus d'un même âge peuvent être de taille différente. Nous avons donc cherché à savoir si l'immunité des chenilles de *Cochylis* pouvait varier entre des individus du même âge, élevés sur une même diète, dans les mêmes conditions, mais de tailles différentes (Vogelweith et al. 2013b). Ainsi, nous avons comparé la variation de la concentration en hémocytes et de l'activité du système PO-PPO sur des chenilles immunologiquement naïves ou stimulées par des bactéries inactives, avant et 24h après la stimulation. Les niveaux de base des paramètres immunitaires ne varient pas avec la taille des chenilles naïves. En revanche, la stimulation immunitaire induit une augmentation de la concentration en hémocytes et de l'activité du système PO-PPO, positivement corrélée avec la taille des chenilles testées. Les chenilles de grande taille présentent une immunocompétence plus forte que les petites qui pourraient être plus vulnérables aux infections. Ce résultat souligne l'importance de prendre en compte la taille des individus dans les études intégrant l'immuno-écologie.

#### **4. Travail en populations naturelles**

##### **Collecte des chenilles dans les vignobles**

Au cours des trois campagnes de terrain, les chenilles d'Eudémis et de *Cochylis* ont été collectées dans différentes régions viticoles de France : Alsace, Aquitaine, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Languedoc-Roussillon, Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte-d'Azur. (Fig. 16), en mai et juin 2011, 2012 et 2013 (correspondant à la première génération de chenilles).



**Figure 16:** Schéma récapitulatif des différentes régions de France échantillonnées lors des trois années de collectes. Chaque diagramme représente le pourcentage d'Eudémis récoltés par cépage dans un vignoble. Les hachures colorées représentent les différents cépages.

Dans chaque région, entre un et trois vignobles, contenant de un à dix cépages de vigne, ont été échantillonnés. Les chenilles issues d'un cépage de vigne sont collectées uniquement lorsque la population est supérieure à 20 chenilles pour 100 grappes, dans des vignobles non traités. Seuls les boutons floraux avec les chenilles sont prélevés, lorsque celles-ci sont entre le quatrième et cinquième stade larvaire. Les chenilles d'Eudémis et de Cochyliis se déplacent rarement d'une grappe à l'autre, par conséquent, chaque larve est supposée avoir achevé son développement sur la grappe où elle a été prélevée (Torres-Vila et al. 1997). Seuls les nids de soie, appelés glomérules (Fig. 17), contenant les chenilles sont collectés afin de réduire le stress occasionné par la collecte.



**Figure 17:** Photographie d'une chenille d'Eudemis au 5<sup>ème</sup> stade larvaire, dans un glomérule ouvert, le glomérule tissé de soie permettant à la chenille de se protéger lors de sa génération de printemps (© F. Vogelweith).

### **Maintien des individus au laboratoire**

Les chenilles et leurs glomérules sont ensuite maintenus au laboratoire dans des bacs en polyéthylène (60 × 40 × 21,4 cm) à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  d'humidité relative et dans les conditions de photopériode naturelle. Le glomérule dans lequel elles se développent leur fournit suffisamment de nourriture pour achever leur développement.

### **Evaluation de l'immunité**

Un premier lot de chenilles est sélectionné aléatoirement pour l'évaluation du succès de parasitisme (voir ci-dessous). Le second lot est constitué de larves n'ayant pas de trace de blessure de parasitoïdes. Chaque chenille ayant atteint le cinquième stade larvaire est minutieusement examinée sous la loupe binoculaire avant d'être isolée dans un bocal en plastique (30 mm de diamètre x 30 mm de hauteur) avec son glomérule et un coton imbibé d'eau jusqu'à ce qu'elle soit utilisée pour les expériences. La présence de blessure causée par le parasitoïde ou la présence d'œuf de parasitoïde peut affecter les paramètres immunitaires des chenilles (Barnes and Siva-Jothy 2000). C'est pourquoi seules les chenilles sans présence de blessure et non parasitées sont utilisées pour les mesures immunitaires.

### **Evaluation du succès de parasitisme**

Les chenilles au cinquième stade larvaire récoltées dans les vignobles sont vérifiées à la loupe binoculaire (NIKON SMZ-10A). Le nombre de blessures par un parasitoïde est comptabilisé. Ces dernières correspondent à une trace noire sur le corps de la larve (Fig. 18). Chaque chrysalide est ensuite isolée individuellement dans un tube en verre (70 × 9 mm de diamètre) fermé par un bouchon en coton jusqu'à l'émergence. Celle-ci est pesée à l'aide d'une balance de précision (précision de 0,1mg, Sartorius) et maintenue dans les conditions standard ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  ;  $70 \pm 10\%$  d'humidité ; photopériode : J16:N8). Les chrysalides sont

également vérifiées tous les jours jusqu'à l'émergence des adultes. Le succès de parasitisme est mesuré *a posteriori* en dénombrant le nombre de parasitoïdes ayant émergé de la manière suivante :  $[\text{nombre de parasitoïdes}/(\text{nombre d'Eudémis} + \text{nombre de parasitoïdes émergés})] \times 100$ .



**Figure 18:** Photographie d'une chenille de *Cochylis* au 5<sup>ème</sup> stade larvaire avec une blessure de parasitoïde (cercle rouge) (© F. Vogelweith).



---

# CHAPITRE I

## **INFLUENCE DU CEPAGE DE VIGNE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES TORDEUSES DE LA VIGNE**

---

# CHAPITRE I

## I. INTRODUCTION

Dans le cadre des interactions tri-trophiques unissant une plante hôte, ses phytophages et leurs ennemis naturels, chaque niveau trophique est fortement dépendant des autres. La multitude d'études portant sur l'impact de la plante hôte sur les insectes phytophages montre de manière unanime que la plante hôte peut fortement affecter les traits d'histoire de vie des phytophages comme le temps de développement (Benrey and Denno 1997) ou encore la fécondité des adultes (Moreau et al. 2006a). De même, ces variations peuvent avoir de fortes répercussions sur les ennemis naturels qui se développent aux dépens de ces phytophages (Ode 2006). Lorsqu'un ennemi naturel de type microorganisme, nématode ou parasitoïde attaque un insecte phytophage, le système immunitaire de ce dernier constitue son principal moyen de défense. Récemment, une hypothèse, de plus en plus étudiée, propose que les paramètres immunitaires des insectes phytophages soient modulés par leur plante hôte, générant ainsi des variations dans leur sensibilité aux agents entomopathogènes. Par exemple, Bukovinszky et al. (2009), ont mis en évidence l'impact de la qualité de l'alimentation sur la réponse immunitaire de la piéride de la rave, *Pieris rapae*, à un œuf du parasitoïde, *Cotesia glomerata*. Les auteurs ont remarqué que les individus élevés sur une plante hôte de bonne qualité nutritive ont un pourcentage d'encapsulation individuel de 80% contre 60% pour les individus issus d'une plante hôte de faible qualité nutritive (Bukovinszky et al. 2009). Cependant, les études visant à tester cette hypothèse montrent des résultats variables et parfois contradictoires. Chaque modèle semble être régi par ses propres lois.

Depuis les années 2000, plusieurs études, toutes concordantes, ont montré une influence significative du cépage de vigne sur les traits d'histoire de vie des Tordeuses de la vigne, notamment sur la durée du développement larvaire, la taille des insectes et le succès reproducteur des adultes (Torres-Vila et al. 1999; Thiery and Moreau 2005; Moreau et al. 2006c; Moreau et al. 2007; Torres-Vila et al. 2005; Sharon et al. 2009). En revanche, beaucoup moins de travaux se sont intéressés à tester l'impact des différents cépages sur les traits d'histoire de vie des parasitoïdes des Tordeuses. Une première étude, publiée en 2009, a montré que le succès d'attaque d'un Trichogramme ainsi que sa survie varient en fonction du cépage sur lequel la chenille d'Eudémis, *Lobesia botrana*, a effectué son développement (Moreau et al. 2009). Les œufs semblent donc constituer des environnements de qualité

différente pour les Trichogrammes. Une seconde étude, réalisée cette fois-ci sur un parasitoïde larvaire (*Campoplex capitator*) (Hymenoptère, Ichneumonidae), de ce même ravageur, a mis en évidence une variation inexpliquée du taux de parasitisme larvaire en fonction des différents cépages de vigne à l'intérieur d'un même vignoble (Moreau et al. 2010). Etant donné que le système immunitaire constitue le moyen de défense le plus efficace des œufs et des larves face à des endoparasitoïdes, les résultats combinés de ces deux études tendent à suggérer un rôle important de ce système immunitaire, qui serait potentiellement sous le contrôle de la plante hôte.

Ces premiers résultats nous invitent donc à prendre en compte l'effet de la variabilité de la qualité de la plante hôte sur l'efficacité des défenses des phytophages contre les parasitoïdes. L'objectif de ce **premier chapitre** est de tester l'hypothèse d'une modulation du système immunitaire des vers de la grappe par le cépage de vigne, agissant ainsi sur leur capacité à se défendre contre les parasitoïdes.

Pour cela, dans un premier temps, des chenilles ont été élevées sur des diètes à base de différents cépages de vigne au laboratoire. Quatre paramètres immunitaires clés ont ensuite été mesurés sur des chenilles en fin de développement. Dans un second temps, une campagne de terrain dans différents vignobles contenant plusieurs cépages de vigne a été réalisée afin de vérifier les résultats précédemment obtenus au laboratoire.

## **II. LE CEPAGE DE VIGNE ET SES CONSEQUENCES SUR L'IMMUNITE DES TORDEUSES DE LA VIGNE, EN LABORATOIRE**

**Annexe 2** – Vogelweith, F., Thiéry, D., Quaglietti, B., Moret, Y. & Moreau, J. (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology*, **25** (6), 1241-1247.

Au cours de cette étude, des chenilles issues d'une souche consanguine de *Cochylis* (*E. ambiguella*) ont été élevées sur cinq diètes artificielles enrichies en baies de différents cépages : Chardonnay, Chasselas, Gewürztraminer, Merlot et Riesling. La survie larvaire, le temps de développement larvaire et la taille des chenilles ont été pris en compte. À la fin de leur développement larvaire, les niveaux de base relatifs à la concentration en hémocytes, de l'activité du système PO-PPO et de l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe ont été mesurés sur des chenilles au 5<sup>ème</sup> stade larvaire. Les changements relatifs à la concentration en

hémocytes et à l'activité du système PO-PPO ont également été mesurés suite à un challenge bactérien stimulant une réponse immunitaire.

Les résultats de cette étude montrent clairement une influence du cépage sur les traits d'histoire de vie mesurés (mortalité larvaire, durée de développement, taille) ainsi que sur les différents paramètres du système immunitaire des chenilles de *Cochylis*. En effet, les chenilles élevées sur la diète enrichie avec des baies de raisin provenant du cépage Gewürztraminer ont une concentration en hémocytes plus importante et une activité du système PO-PPO plus forte que les individus élevés sur les diètes enrichies avec des baies de raisin issues des autres cépages, ou encore sur la diète contrôle (nourriture artificielle utilisée pour l'élevage de routine). À l'inverse, ces mêmes chenilles issues du Gewürztraminer ont une activité antimicrobienne réduite par rapport à celle des chenilles élevées sur les autres diètes. Ainsi, un compromis entre les différentes voies du système immunitaire (constitutives et induites) a pu être mis en évidence, à l'image des résultats obtenus sur les diètes contrôle et enrichie en Gewürztraminer. Suite à une stimulation immunitaire, seules les chenilles élevées sur la diète enrichie en Chardonnay montrent une augmentation de la concentration en hémocytes. En revanche, la stimulation immunitaire n'affecte pas l'activité du système PO-PPO.

### **III. LE CEPAGE DE VIGNE INFLUENCE-T-IL EGALEMENT L'IMMUNITE DES TORDEUSES, *IN NATURA* ?**

Par la suite, nous avons voulu vérifier, *in natura*, la validité du résultat ci-dessus sur une espèce proche de *Cochylis*, l'Eudémis (*L. botrana*).

#### ***Matériel et méthodes***

Des Eudémis en fin de quatrième stade larvaire ont été échantillonnées dans trois vignobles français, en mai 2012 (correspondant à la première génération de Tordeuses) : les vignobles Polygone (PO) et Rivesaltes (RI) en région Languedoc-Roussillon et le vignoble Plateau de Roquemartine (PR) en région Provence-Alpes-Côte d'Azur. Dans chaque vignoble, entre trois et quatre cépages ont été étudiés, soit un total de sept cépages de vigne : Carignan (ca), Grenache (gr), Macabeu (ma), Mourvèdre (mo), Muscat (mu), Syrah (sy).

La collecte des chenilles, leur maintien et les mesures réalisées sont détaillés dans le chapitre « Matériel et méthodes générales ». Le lecteur est invité à s'y référer pour obtenir de

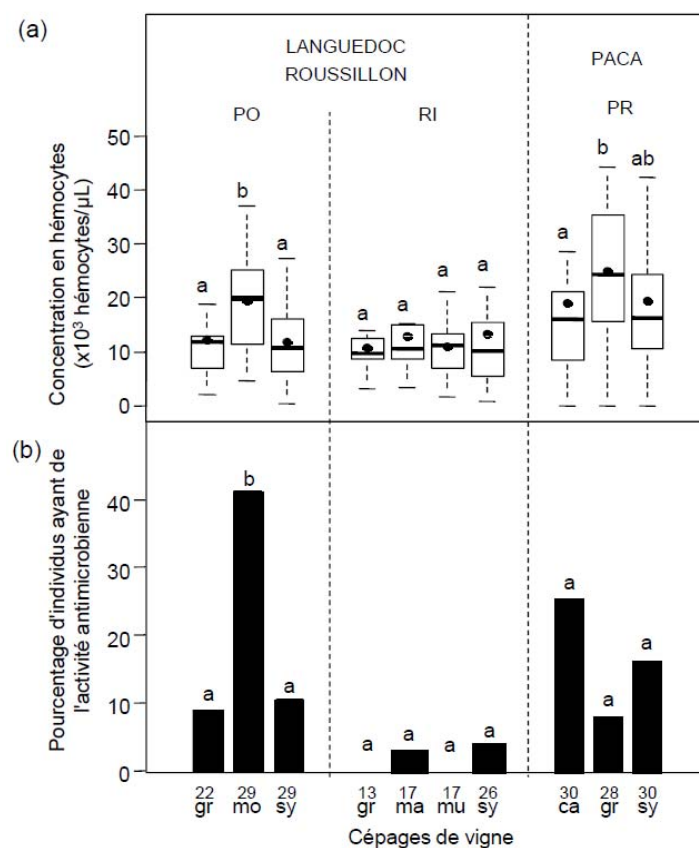
plus amples informations. Trois paramètres immunitaires ont été mesurés sur les chenilles au cinquième stade larvaire : la concentration en hémocytes, l'activité du système PO-PPO et l'activité antimicrobienne.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 2.11.1), à un seuil de significativité  $\alpha = 0.05$ . L'influence du cépage de vigne sur la concentration en hémocytes, l'activité PO et l'activité PO-totale ont été testés par un test de Kruskal-Wallis, les données n'étant pas distribuées normalement au sein de chaque vignoble. L'activité antimicrobienne suivait une distribution binomiale, la différence entre les cépages a donc été mise en évidence grâce à un test du  $\chi^2$  de Pearson. Les relations entre les quatre paramètres immunitaires, mesurés sur un même individu, ont été examinées par des tests de corrélation de Spearman.

## **Résultats**

La concentration en hémocytes des chenilles d'Eudémis est influencée par le cépage de vigne dans deux vignobles (Polygone et Plateau de Roquemartine ; Tab. 2 ; Fig. 19a). Par exemple, dans le vignoble Polygone, les chenilles issues du Mourvèdre ont une concentration en hémocytes plus importante que celles collectées sur Grenache et Syrah. Contrairement à l'activité PO-totale qui n'est pas influencée par le cépage de vigne (Tab. 2), l'activité PO est affectée par le cépage de vigne dans deux vignobles testés (Polygone et Rivesaltes). À Rivesaltes, les larves récoltées sur Macabeu et Syrah ont plus d'enzymes PO (respectivement 10623 et 6551 miliunités/min) et que les chenilles collectées sur Grenache (3603 valeurs de miliunités/min). Enfin, dans le vignoble Polygone, 41% des chenilles issues du Mourvèdre ont une activité antimicrobienne contre 9% des chenilles issues du Grenache (Tab. 2 ; Fig. 19b).

La concentration en hémocytes est positivement corrélée avec les activités PO (excepté pour le Plateau de Roquemartine) et PO-totale, celles-ci étant également positivement corrélées entre elles (Tab. 3). En revanche, il n'y a aucune relation entre l'activité antimicrobienne et les trois autres paramètres immunitaires (Tab. 3).



**Figure 19:** (a) Concentration en hémocytes ( $\times 10^3$  haemocytes  $\mu\text{L}^{-1}$ ) dans l'hémolymphe des chenilles issues des différents cépages de vigne. Les bords des rectangles représentent les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles ; la barre du milieu en gras est la médiane, les lignes pointillées sont les minima et maxima ; et le rond noir est la moyenne. (b) Pourcentage de chenilles ayant une activité antimicrobienne en fonction des cépages de vigne. Au sein de chaque vignoble, les cépages de vigne portant la même lettre indique qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ). Pour chaque cépage de vigne, le nombre de chenilles testées est indiqué au dessous de l'axe des abscisses. Voir le matériel et méthodes pour les acronymes.

**Tableau 2:** Influence du cépage de vigne sur la concentration en hémocytes, l'activité PO, l'activité PO-totale et l'activité antimicrobienne. Les valeurs significatives ( $P \leq 0.05$ ) sont en gras. <sup>a</sup> test de Kruskal-Wallis; <sup>b</sup> test du  $\chi^2$  de Pearson's. Se référer au matériel et méthodes pour les acronymes.

| Vignobles <sub>df</sub> | Concentration en hémocytes <sup>a</sup> |              | Activité PO <sup>a</sup> |             | Activité PO-totale <sup>a</sup> |          | Activité antimicrobienne <sup>b</sup> |              |
|-------------------------|-----------------------------------------|--------------|--------------------------|-------------|---------------------------------|----------|---------------------------------------|--------------|
|                         | $\chi$                                  | <i>P</i>     | <i>X</i>                 | <i>P</i>    | <i>X</i>                        | <i>P</i> | $\chi^2$                              | <i>P</i>     |
| PO <sub>2</sub>         | <b>19.90</b>                            | <b>0.001</b> | <b>7.39</b>              | <b>0.04</b> | 4.60                            | 0.1      | <b>12.77</b>                          | <b>0.002</b> |
| RI <sub>3</sub>         | 0.30                                    | 0.96         | <b>8.97</b>              | <b>0.03</b> | 2.58                            | 0.46     | 2.47                                  | 0.48         |
| PR <sub>2</sub>         | <b>9.32</b>                             | <b>0.009</b> | 4.22                     | 0.12        | 4.73                            | 0.09     | 2.93                                  | 0.22         |

**Tableau 3:** Matrice de corrélations de Spearman pour les différents paramètres immunitaires : concentration en hémocytes, activités PO et PO-totale et activité antimicrobienne. La lettre *p* indique le coefficient de corrélation. Les valeurs significatives sont représentées en gras ( $p < 0.05$ ).

|                            |        | Activité PO   |              |      | Activité PO-totale |                    |                    | Activité antimicrobienne |        |        |
|----------------------------|--------|---------------|--------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------|--------|
| Vignobles                  |        | PO            | RI           | PR   | PO                 | RI                 | PR                 | PO                       | RI     | PR     |
| Concentration en hémocytes | $\rho$ | <b>0.34</b>   | <b>0.26</b>  | 0.11 | <b>0.32</b>        | <b>0.27</b>        | <b>0.26</b>        | - 0.01                   | - 0.11 | - 0.05 |
|                            | P      | <b>0.0006</b> | <b>0.025</b> | 0.3  | <b>0.001</b>       | <b>0.02</b>        | <b>0.012</b>       | 0.89                     | 0.39   | 0.68   |
| Activité PO                | $\rho$ | -             | -            |      | <b>0.75</b>        | <b>0.58</b>        | <b>0.66</b>        | 0.07                     | 0.026  | - 0.16 |
|                            | P      | -             | -            |      | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>&lt; 0.0001</b> | 0.49                     | 0.84   | 0.15   |
| Activité PO-totale         | $\rho$ | -             | -            |      | -                  | -                  | -                  | 0.03                     | - 0.17 | - 0.14 |
|                            | P      | -             | -            |      | -                  | -                  | -                  | 0.73                     | 0.18   | 0.23   |

#### IV. DISCUSSION DU CHAPITRE

L'objectif de ce premier chapitre était de tester l'influence du cépage de vigne sur le système immunitaire des vers de la grappe, en laboratoire et de vérifier ces résultats *in natura*.

La première partie de ce chapitre montre, sans équivoque, une forte influence de la qualité de l'alimentation sur la survie, la durée du développement larvaire ainsi que sur la taille des chenilles. Parallèlement à la variation de ces trois traits d'histoire de vie, nous avons mis en évidence une forte variation des paramètres immunitaires mesurés, en fonction de la diète sur laquelle les chenilles s'étaient développées. De plus, un compromis entre les différentes voies du système immunitaire (constitutives et induites) a pu être mis en évidence. La seconde partie de ce chapitre, en populations naturelles, confirme les résultats obtenus en laboratoire, sur une espèce proche. Malgré des résultats plus contrastés, le cépage de vigne influence également les différents paramètres immunitaires des chenilles, *in natura*.

Que se soit en laboratoire ou sur le terrain, les diètes et cépages de vigne étudiés avaient les mêmes caractéristiques physiques (stade de maturité de la vigne, densité, sol...). Ainsi la variation constatée pour les différents traits d'histoire de vie testés, résulte des différences chimiques propres à chaque cépage de vigne.

Excepté pour l'activité PO-totale *in natura*, tous les paramètres immunitaires testés au cours de ces deux études sont affectés par la diète ou le cépage de vigne sur lequel les chenilles se sont développées. En laboratoire, les chenilles élevées sur du Gewürztraminer se détachent des autres avec une activité enzymatique du système PO-PPO beaucoup plus importante et une activité antimicrobienne beaucoup plus faible que les chenilles élevées sur du Chasselas ou du Chardonnay. L'activité antimicrobienne dans l'hémolymphe des insectes résulte d'une production induite de peptides antimicrobiens (Hoffmann et al. 1996; Haine et al. 2008), souvent associée à une réduction de l'activité du système PO-PPO (Moret and Schmid-Hempel 2000), résultat obtenu pour les chenilles élevées sur Chardonnay, Chasselas et la diète contrôle. L'activité antimicrobienne peut donc avoir été induite par la consommation de micro-organismes qui croissent sur les diètes artificielles. De plus, il est largement reconnu que la surface et l'intérieur des baies contiennent un important cortège de micro-organismes (Renouf et al. 2005). En outre, les composés chimiques des baies pourraient également avoir une action antibiotique et limiter la croissance des bactéries (Visser 2011). En se protégeant, les plantes peuvent indirectement protéger les phytophages qui s'y nourrissent, contre les micro-organismes. Ainsi, les chenilles n'auraient pas à investir

dans l'activité antimicrobienne et pourraient d'avantage investir dans l'activité du système PO-PPO, à l'image des chenilles issues du Gewürztraminer.

L'influence du cépage de vigne sur l'immunité des vers de la grappe est moins contrastée en population naturelle mais reste présente, à l'image du vignoble Polygone où les chenilles récoltées sur le Mourvèdre possèdent une concentration en hémocytes, une activité PO et une activité antimicrobienne plus importante que les chenilles issues d'autres cépages. A l'inverse l'effet du cépage sur les paramètres immunitaires des chenilles n'est pas retrouvé dans tous les vignobles, tel que le vignoble Rivesaltes. Toutefois, il existe bien un effet du cépage de vigne sur les paramètres immunitaires d'Eudémis, confirmant nos résultats obtenus en laboratoire sur une espèce proche.

Cependant, le compromis entre les voies immunitaires constitutives et induites n'est pas retrouvé en populations naturelles. De nombreux facteurs peuvent l'expliquer. En premier lieu, les deux études présentées ci-dessus ont été réalisées sur deux espèces différentes, *Cochylis* en laboratoire et *Eudémis* sur le terrain. Bien que phylogénétiquement proches, ces deux espèces réagissent peut être différemment aux pressions de sélection issues du parasitisme par exemple (se référer au chapitre V pour la comparaison entre les deux espèces). Ensuite, contrairement au laboratoire où les conditions sont contrôlées, les chenilles issues des vignobles sont soumises à des facteurs abiotiques très variables (pluviométrie, température, climat etc.) mais aussi biotiques, tels que les prédateurs et les parasitoïdes, qui peuvent exercer une forte pression de sélection, influençant ainsi le système immunitaire (Adamo and Lovett 2011; Linder et al. 2008). Ces pressions de sélection seront évoquées plus longuement dans le chapitre III de cette thèse.

En conclusion de ce premier chapitre, le cépage de vigne joue donc un rôle important sur les traits d'histoire de vie des vers de la grappe (*Eudémis* et *Cochylis*), notamment sur le système immunitaire de ceux-ci. Afin de mieux comprendre l'origine de ces variations immunitaires entre les différents cépages, des études complémentaires sont nécessaires. L'origine du compromis entre les différentes voies immunitaires sera donc développée dans le deuxième chapitre de cette thèse. Si ces variations du système immunitaire induites par la plante hôte se répercutent sur une réelle capacité de résistance, alors nos résultats tendront à montrer un effet potentiellement important de la plante hôte dans la régulation des communautés, *via* le système immunitaire des insectes phytophages.

---

---

## CHAPITRE II

### **TENTATIVES D'EXPLICATIONS DU COMPROMIS OBSERVE ENTRE LES VOIES CONSTITUTIVES ET INDUITES CHEZ COCHYLIS**

---

## CHAPITRE II

Au cours du chapitre précédent, un compromis entre les voies constitutives et induites du système immunitaire des vers de la grappe, modulé par la plante hôte, a été mis en évidence. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce compromis, notamment la présence de micro-organismes à la surface des baies de raisin. Le but de ce **deuxième chapitre** était de vérifier l'hypothèse selon laquelle les baies de raisin de certains cépages pourraient réduire/inhiber la croissance bactérienne à la surface et à l'intérieur du fruit. Ainsi, les chenilles se développant sur des baies où le cortège bactérien est réduit, n'auront pas à investir dans l'activité antimicrobienne et pourront investir davantage dans l'activité PO-PPO.

**Annexe 3** – Vogelweith, F., Moreau, J, Thiéry, D. & Moret, Y. *Food-mediated modulation of immunity in a phytophagous insect: an effect of nutrition rather than parasitic contamination.*

Lors de cette étude, l'activité antimicrobienne de baies de raisin de six cépages de vigne a été mesurée. Deux cépages de vigne, Chardonnay et Pinot Noir, montrant des activités antimicrobiennes contrastées ont été sélectionnés. Une concentration de tétracycline équivalente à l'activité antimicrobienne des baies de chaque cépage a ensuite été établie à l'aide d'une gamme d'inhibition de croissance bactérienne par la tétracycline. Par la suite, des chenilles issues d'une souche consanguine de *Cochylis* (*E. ambiguella*) ont été élevées sur des diètes artificielles supplémentées avec différentes concentrations de tétracycline. L'ajout d'une concentration plus ou moins importante de cet antibiotique mimera l'activité antimicrobienne des baies de Chardonnay et Pinot Noir précédemment mesurée. De plus, une diète artificielle supplémentée en bactéries a été ajoutée à l'expérience afin de tester l'influence de la consommation de bactéries par les chenilles sur leurs paramètres immunitaires. La diète artificielle de l'élevage a été utilisée comme diète contrôle.

Parallèlement des chenilles ont également été élevées sur des diètes artificielles enrichies en baies de deux cépages : Chardonnay et Pinot Noir.

La survie larvaire et la taille des chenilles ont été prises en compte. A la fin de leur développement larvaire (cinquième stade larvaire), le niveau basal en hémocytes, l'activité du

système PO-PPO et l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe ont été mesurés sur les chenilles au cinquième stade larvaire.

Les résultats attendus étaient un faible investissement dans l'activité antimicrobienne pour les chenilles élevées sur les diètes enrichies en forte concentration de tétracycline puisque cette dernière inhibe la croissance bactérienne.

L'activité antimicrobienne des baies est fortement influencée par le cépage de vigne. Par exemple, les baies de Pinot Noir ont une activité antimicrobienne beaucoup plus importante que les baies de Chardonnay.

La survie larvaire est affectée par la diète sur laquelle les chenilles se sont développées. En revanche, quelque soit la taille des chenilles ou le paramètre immunitaire considéré, les défenses immunitaires des chenilles ne sont pas affectées par la concentration en tétracycline. Il en est de même pour les défenses immunitaires des chenilles s'étant développées sur la diète enrichie en bactéries ainsi que sur la diète contrôle. Cependant, le compromis observé dans le chapitre précédent sur les diètes enrichies en cépages de vignes (ici le Chardonnay et le Pinot Noir) est retrouvé. En effet, les chenilles élevées sur Chardonnay tendent à avoir moins d'activité PO et plus d'activité antimicrobienne tandis que les chenilles élevées sur Pinot Noir possèdent plus d'activité PO et moins d'activité antimicrobienne.

Au regard de nos résultats, il semble donc que le compromis observé entre les voies induites et constitutives décrit dans le chapitre I ne serait pas dû à une différence d'activité antimicrobienne des baies, même si celle-ci est bien présente. Il est donc envisageable que ce compromis observé soit plutôt dû à la présence ou à l'absence d'un ou plusieurs composés uniquement dans les baies de certains cépages. Pour répondre à cette question, des analyses chimiques des baies mais également des chenilles seraient nécessaires afin de cibler les composés qui diffèrent entre les cépages de vignes et ceux qui sont stockés par les chenilles. En effet, des composés de la vigne, tel que l'acide caféique, pourraient agir directement sur les paramètres immunitaires et altérer ou au contraire stimuler l'immunocompétence des chenilles.



---

## CHAPITRE III

### **FORCES ECOLOGIQUES ASCENDANTES ET DESCENDANTES DE REGULATION DE L'IMMUNITE D'EUEMIS : LES CEPAGES ET LE PARASITISME.**

---

## CHAPITRE III

Au cours du premier chapitre, nous avons mis en évidence l'influence du cépage de vigne sur l'immunité des vers de la grappe (régulation ascendante). Néanmoins, en populations naturelles, les chenilles sont soumises à de nombreuses pressions de sélection qui peuvent également moduler leurs moyens de défenses. Les ennemis naturels, incluant les parasitoïdes, sont une des principales sources de mortalité des insectes phytophages (régulation descendante). Le système immunitaire des insectes cibles est alors un des moyens de défense les plus efficaces contre ces ennemis naturels.

L'objectif de ce **troisième chapitre** consistait à mettre en évidence l'action conjointe des forces ascendantes (la vigne) et descendantes (les parasitoïdes) sur le système immunitaire des vers de grappe, *in natura*, dans les vignobles.

**Annexe 4** – Vogelweith, F., Dourneau, M., Thiéry, D., Moret, Y. & Moreau, J. Geographical variation in parasite prevalence shapes larval immunity in the phytophagous European grapevine moth larvae, *accepté par Naturwissenschaften*.

Les deux principaux objectifs en immuno-écologie consistent à comprendre les variations naturelles du système immunitaire entre les populations d'une part et d'identifier les pressions de sélection qui modulent les paramètres immunitaires d'autre part. Le système immunitaire est supposé coûteux métaboliquement et évolutivement, et le maintien d'un tel système de défense suppose qu'il procure un avantage adaptatif important. Les facteurs environnementaux doivent alors jouer un rôle prépondérant dans sa régulation et son maintien. Ainsi, la qualité de la nourriture mais aussi les pressions de sélection opérées par les ennemis naturels sont des facteurs potentiellement importants qui modulent l'immunité des insectes.

Dans les interactions tri-trophiques impliquant la plante hôte, les insectes phytophages, et leurs ennemis naturels, l'immunité des insectes phytophages est contrainte par les forces sélectives émanant à la fois des plantes hôtes mais également des ennemis naturels. Dans cette étude réalisée sur des populations naturelles, nous avons évalué les rôles respectifs de la plante hôte mais aussi des ennemis naturels, comme pressions de sélection sur les variations immunitaires entre différentes populations de *L. botrana*.

Pour cela, des chenilles d'Eudémis au quatrième stade larvaire ont été prélevées en mai-juin 2011 dans 11 vignobles répartis dans six régions viticoles de France ; chaque vignoble contenant entre un et cinq cépages différents. Un premier échantillon de chenilles, choisies aléatoirement, a été utilisé afin d'évaluer le succès de parasitisme *a posteriori*, en laissant les chenilles atteindre l'éclosion (soit un adulte Eudémis, soit un parasitoïde). Dans le second échantillon, la taille des chenilles a été mesurée puis un prélèvement d'hémolymphe a été réalisé afin d'évaluer les défenses immunitaires des chenilles à l'aide des quatre paramètres immunitaires clés déjà décrits dans les chapitres précédents.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent une importante variation géographique des défenses immunitaires des chenilles.

Premièrement, nous avons mis en évidence une régulation ascendante, se traduisant par un effet du cépage de vigne sur les paramètres immunitaires des chenilles, au sein d'un vignoble, confortant ainsi les résultats obtenus précédemment en laboratoire (chapitre I).

Deuxièmement, nous avons observé un succès de parasitisme très variable en fonction des vignobles. De plus, notre étude a mis en évidence une corrélation positive entre les paramètres immunitaires des chenilles et le succès de parasitisme des populations d'Eudémis. Ainsi, les populations les plus parasitées sont également les populations où les paramètres immunitaires des chenilles sont les plus fortement exprimés. Ces résultats suggèrent une pression de sélection des parasitoïdes en faveur des chenilles ayant un investissement dans l'immunité plus important, illustrant ainsi une force ascendante.

Les paramètres immunitaires des chenilles sont positivement corrélés à la température dans les vignobles. Ainsi les populations avec les plus fortes températures étaient également les populations où les paramètres immunitaires des chenilles étaient les plus élevés.

Par ailleurs, les populations avec de forts paramètres immunitaires sont également celles où la taille des chenilles au cinquième stade larvaire est la plus petite. Cette corrélation négative entre immunité et taille des chenilles suggère fortement un coût métabolique au maintien des paramètres immunitaires.

Cette étude nous a donc permis de souligner l'importance de l'action conjuguée de la plante hôte et des ennemis naturels comme forces sélectives modulant l'immunité des insectes phytophages. Elle a également permis de souligner le coût métabolique lié à un investissement important dans l'immunité, mais aussi l'influence parfois négligée de l'environnement, évalué ici grâce à la température. Ce genre d'étude est essentiel pour comprendre l'action des forces sélectives qui régissent l'immunité des insectes phytophages.

D'autres études sont nécessaires afin de comprendre si la modulation de l'immunité résulte d'une adaptation locale *via* la sélection des individus les plus immunocompétents dans les populations soumises à une forte pression de parasitoïdes, ou d'une plasticité phénotypique *via* l'élévation de l'immunocompétence des chenilles suite à une détection précoce des parasitoïdes dans leur environnement. Cette question fera l'objet du chapitre suivant (chapitre IV).

---

## CHAPITRE IV

**SOURCES DE VARIATIONS DANS L'INVESTISSEMENT**

**IMMUNITAIRE :**

**REPONSE PLASTIQUE OU SELECTION DES DEFENSES**

**IMMUNITAIRES**

---

## CHAPITRE IV

Le chapitre précédent (chapitre III) nous a permis de mettre en évidence l'action conjointe de la plante hôte et des ennemis naturels comme forces sélectives modulant l'immunité des insectes phytophages. Ainsi, nous avons montré que les populations naturelles d'Eudémis les plus parasitées étaient également les populations où les paramètres immunitaires (concentration en hémocytes, activité du système PO-PPO, activité antimicrobienne) des chenilles étaient les plus fortement exprimés.

Le but de ce **quatrième chapitre** était de tenter d'expliquer cette corrélation positive entre les paramètres immunitaires et le succès de parasitisme dans les populations naturelles d'Eudémis. Au moins deux grandes hypothèses pouvaient être émises afin d'expliquer cette relation. La première hypothèse impliquait une **réponse plastique** du système immunitaire des chenilles suite à une détection précoce des parasitoïdes avant leur attaque. Dans ce contexte, les chenilles en présence de parasitoïdes pourraient augmenter leurs paramètres immunitaires afin de se préparer à contrer cette attaque. La seconde hypothèse qui pouvait expliquer la relation positive entre paramètres immunitaires et succès de parasitisme impliquait quant-à-elle une **sélection des défenses immunitaires** des chenilles en fonction des pressions exercées par les parasitoïdes à l'échelle de la population locale. Dans les populations soumises à de fortes pressions de parasitoïdes, seules les chenilles ayant des paramètres immunitaires assez élevés pour contrer le développement d'un œuf de parasitoïde vont survivre et ainsi entraîner la sélection, au cours des générations, des chenilles possédant les paramètres immunitaires les plus élevés. A l'inverse, les populations soumises à de faibles pressions de parasitoïdes n'auront pas besoin d'investir fortement dans les paramètres immunitaires.

Afin de trancher entre ces deux hypothèses explicatives, qui pourraient être non exclusives, nous avons réalisé des expériences au laboratoire pour tester cette réponse plastique, et *in natura* pour déterminer si une adaptation locale de l'immunité pouvait exister au sein des populations de chenilles d'Eudémis.

**Annexe 5 – Vogelweith, F., Moret, Y., Thiéry, D., Delbac, L. & Moreau, J. Which processes shape the grapevine moth immune response against parasitism?**

Afin de tester l'hypothèse d'une réponse plastique de l'immunité à la présence de parasitoïdes, deux expériences ont été réalisées au laboratoire. La première expérience a été effectuée sur des chenilles d'Eudémis issues de l'élevage, en fin de développement larvaire (cinquième stade larvaire). Cinq chenilles ont été mises en présence ou absence d'une femelle parasitoïde pendant six jours dans une arène expérimentale. Ce dispositif nous assurait qu'aucun contact physique n'était possible entre les chenilles et le parasitoïde, impliquant que seuls les canaux olfactifs, visuels et vibratoires de la chenille pouvaient permettre la détection des parasitoïdes. Deux espèces de parasitoïdes naturels d'Eudémis, parmi les plus communs recensés dans les populations naturelles, ont été testées : un hyménoptère, *Campoplex capitator* et un diptère, *Phytomyptera nigrina*. Après les six jours d'exposition, le niveau basal en hémocytes et l'activité du système PO-PPO de l'hémolymph des chenilles ont été évalués. Afin de confirmer le résultat de la première expérience, une seconde expérience a été mise en place avec cette fois-ci des chenilles plus jeunes (deuxième stade larvaire), et testées individuellement (excluant un éventuel effet groupe lors de la première expérience). Ces jeunes chenilles ont été mises en présence ou absence d'une femelle parasitoïde *C. capitator*. Comme précédemment, après les six jours d'exposition, le niveau basal en hémocytes et l'activité du système PO-PPO de l'hémolymph des chenilles ont été évalués.

Quelque soit l'expérience réalisée, il n'y a pas de différence entre les paramètres immunitaires des chenilles exposées aux parasitoïdes comparés aux chenilles non exposées, qu'il s'agisse de la concentration en hémocytes ou de l'activité du système PO-PPO. Ces deux expériences montrent donc que l'hypothèse d'une modulation plastique des paramètres immunitaires des chenilles face à un parasitoïde, pour se préparer à une éventuelle attaque ne semble pas exister chez cette espèce.

Dans le but de tester l'hypothèse d'une sélection des défenses immunitaires des chenilles à la pression exercée par les parasitoïdes, un suivi du succès de parasitisme de neuf populations naturelles d'Eudémis a été réalisé entre 2008 et 2012. Ce suivi nous a permis de calculer une moyenne du succès de parasitisme pour chaque population d'Eudémis testée, toute année confondue. Cette moyenne représente donc un indice de la pression exercée par les parasitoïdes sur plusieurs années. Globalement, ce suivi montre que certaines populations d'Eudémis subissent toujours une forte pression d'attaque de parasitoïdes alors que d'autres ne sont que très peu confrontées aux parasitoïdes. Au cours de la dernière année de suivi (2012), le niveau basal en hémocytes et l'activité du système PO-PPO de l'hémolymph des

chenilles saines (non infectées par un parasitoïde, vérification par dissection) de ces populations ont été évalués.

La mise en relation entre cet indice de pression de parasitisme et l'évaluation des paramètres immunitaires des chenilles en 2012 montrent une relation positive entre la concentration en hémocytes moyenne des chenilles et le succès de parasitisme moyen des populations. L'activité PO ainsi que la valeur synthétique du système immunitaire (obtenue suite à une Analyse en Composantes Principales) sont également corrélées positivement au succès de parasitisme moyen des populations d'Eudémis. De manière générale, ces résultats sous-tendent donc que les populations avec les paramètres immunitaires les plus élevés sont également celles qui ont subi les plus fortes pressions de parasitoïdes au cours de ces cinq années de suivi.

En conclusion, nos résultats tendent fortement à réfuter l'hypothèse d'une réponse plastique de l'immunité des chenilles lorsqu'elles sont en présence de parasitoïdes, au profit de l'hypothèse impliquant une sélection des défenses immunitaires des chenilles aux pressions exercées par les parasitoïdes. Années après années, la forte présence de parasitoïdes dans certains vignobles a certainement sélectionné les chenilles les plus résistantes aux parasitoïdes entraînant une augmentation des paramètres immunitaires dans ces mêmes populations. Afin de confirmer ce résultat, un échantillonnage d'un plus grand nombre de populations ainsi que des mesures de différenciations génétiques semblent toutefois indispensables.

---

## CHAPITRE V

### **COCHYLIS *VERSUS* EUDEMIS : COMPARAISON INTERSPECIFIQUE DE L'INVESTISSEMENT DANS LES BARRIERES DE DEFENSES**

---

# CHAPITRE V

## I. INTRODUCTION

Comme nous avons pu le mettre en évidence dans les chapitres précédents, les parasitoïdes exercent une force sélective très importante sur l'immunité des vers de la grappe. En effet, les ennemis naturels et principalement les parasitoïdes sont la source principale de mortalité des insectes phytophages (Hawkins et al. 1997). En réponse à ces agressions, les insectes ont développé un important arsenal de défenses comportant des barrières comportementales, morphologiques, physiologiques ou encore immunologiques (Gross 1993; Greeney et al. 2012). Cependant, les ressources étant limitées et ces défenses coûteuses (Rigby and Jokela 2000), les individus ne peuvent investir dans toutes les barrières de défenses. De nombreuses études ont déjà mis en évidence des compromis entre les défenses morphologiques et comportementales (Steiner and Pfeiffer 2007; Mikolajewski and Johansson 2004) ou encore entre les défenses comportementales et immunologiques (Rigby and Jokela 2000). Il est donc important de considérer une approche intégrant plusieurs barrières de défenses afin de comprendre l'évolution des relations hôte-ennemis naturels. L'étude d'espèces proches partageant le même environnement et le même cortège d'ennemis naturels permettrait d'avoir une image complète de la relation unissant les différents traits défensifs ainsi que leur action.

Les vers de la grappe, Cochylis (*Eupoecilia ambiguella*) et Eudémis (*Lobesia botrana*) sont deux des principaux ravageurs de la vigne en Europe vivant en sympatrie, partageant le même cortège parasitaire, elles apparaissent donc comme des candidats idéaux.

L'objectif de ce **cinquième et dernier chapitre** était donc d'évaluer et de comparer l'investissement de chacune des espèces dans les différentes barrières de défenses (morphologiques, comportementales et immunitaires). Dans un second temps, afin de relier ces mesures au succès de parasitisme des parasitoïdes en populations naturelles, des tests de choix ont également été réalisés. Ils nous ont ainsi permis de vérifier si les parasitoïdes larvaires préféraient l'une des deux espèces, et de relier ce choix à l'investissement des chenilles dans les différentes barrières de défenses.

## II. INVESTISSEMENT DANS LES DIFFERENTES BARRIERES DE DEFENSES

**Annexe 6** – Vogelweith, F., Thiéry, D., Moret, Y., Colin, E., Motreuil, S. & Moreau, J. Defense strategies used by two sympatric moth pest of vineyards.

Afin d'évaluer l'investissement dans les différentes barrières de défenses, des chenilles de *Cochylis* et d'*Eudémis* provenant de l'élevage de l'INRA de Bordeaux et d'une population naturelle de *Cochylis* et d'*Eudémis* prélevée sur Cabernet Franc dans le vignoble Château Brillette (Aquitaine) ont été étudiées. Plusieurs barrières de défenses ont ainsi été évaluées au moyen de différentes mesures sur des chenilles au cinquième stade larvaire. Les défenses physiques ont été appréhendées par la mesure de la résistance et de l'épaisseur de la peau. Les défenses comportementales ont été évaluées par des mesures d'activité, de nombre de débâtements suite à un stimulus physique mimant une pique de parasitoïde ainsi que par la présence et la taille du fil dans le cas d'une chute. Puis, les défenses physiologiques ont été estimées via des mesures immunitaires basales (concentration en hémocytes, activité du système PO-PPO, activité antimicrobienne) et après une stimulation du système immunitaire à l'aide de bactéries inactivées.

Par la suite, des chenilles d'*Eudémis* et *Cochylis* au cinquième stade larvaire ont été récoltées en population naturelle, au sein d'un même vignoble, sur le même cépage. Le succès de parasitisme a été évalué *a posteriori* en laissant les individus atteindre l'éclosion.

Quelque soit la barrière de défenses impliquée, les résultats montrent sans équivoque une différence importante entre les deux espèces, quelles soient issues de l'élevage ou de population naturelle (Tab. 4). Ainsi, la résistance de la peau à une pique est plus importante chez *Cochylis* due à une épaisseur plus importante comparée à la peau d'*Eudémis*. En revanche, les chenilles d'*Eudémis* sont beaucoup plus actives, se débattent plus et tissent de plus grands fils lors d'une chute (Tab. 4). La concentration en hémocytes et l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe ne diffèrent pas entre les deux espèces, contrairement à l'activité du système PO-PPO qui est plus importante chez *Eudémis* (Tab. 4). Les résultats de la stimulation immunitaire sont assez marquants puisque les chenilles d'*Eudémis* ne montrent aucune variation des effecteurs immunitaires suite à l'injection des bactéries inactives dans leur hémocœle alors que les chenilles de *Cochylis* augmentent d'une fois et demie leur concentration en hémocytes (Tab. 4).

**Tableau 4:** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par *Cochylis* et *Eudémis* pour les différentes mesures réalisées. Les "+" indiquent un investissement plus important de l'espèce dans le paramètre mesuré. Les "-" indiquent un investissement moins important de l'espèce dans le paramètre mesuré. Les "=" indiquent qu'il n'y a pas de différence d'investissement dans ce paramètre pour les deux espèces.

| Mesures réalisées                          |                               | Cochylis | Eudémis |
|--------------------------------------------|-------------------------------|----------|---------|
| <b>Barrière physique</b>                   | <i>Résistance de la peau</i>  | +        | -       |
|                                            | <i>Epaisseur de la peau</i>   | +        | -       |
| <b>Barrière comportementale</b>            | <i>Activité</i>               | -        | +       |
|                                            | <i>Débattement</i>            | -        | +       |
|                                            | <i>Fil</i>                    | -        | +       |
| <b>Barrière physiologique : l'immunité</b> | <i>Immunité basale</i>        |          |         |
|                                            | Concentration en hémocytes    | =        | =       |
|                                            | Activité PO                   | -        | +       |
|                                            | Activité PO-totale (PO + PPO) | -        | +       |
|                                            | Activité antimicrobienne      | =        | =       |
|                                            | <i>Challenge immunitaire</i>  |          |         |
|                                            | Concentration en hémocytes    | +        | -       |
|                                            | Activité PO                   | +        | -       |
|                                            | Activité PO-totale (PO + PPO) | -        | -       |
|                                            |                               |          |         |

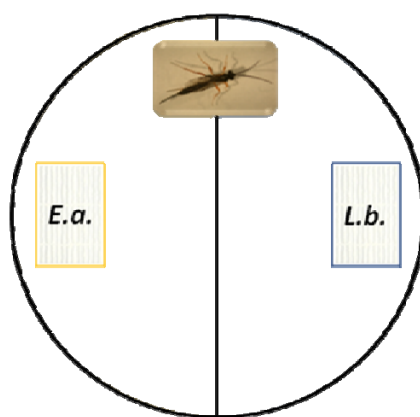
Enfin, en population naturelle, les chenilles d'*Eudémis* étaient plus parasitées que celles de *Cochylis* se développant sur un même cépage, dans un même vignoble.

### III. TEST DE CHOIX DES FEMELLES PARASITOÏDES

Contrairement à l'expérience précédente ciblée sur les chenilles et leur investissement dans les différentes barrières de défenses, cette expérience se plaçait au niveau trophique supérieur, celui des femelles parasitoïdes. Le but de cette expérience était de voir la préférence de ponte des femelles parasitoïdes lorsqu'elles étaient en présence des deux espèces de vers de la grappe.

## Matériel et méthodes

Des chenilles des deux espèces, *Cochylis* et *Eudémis*, provenant de l'élevage de l'INRA de Bordeaux (voir Matériels et Méthodes générales pour plus de précisions), maintenues et élevées séparément dans les mêmes conditions, sur la même diète artificielle ont été testées. Les chenilles, ayant atteint le quatrième stade larvaire, ont été placées dans des papiers gaufrés, surface qu'elles affectionnent pour se cacher. Ces papiers ont été découpés de manière à n'avoir qu'une seule chenille par papier. Les papiers contenant les chenilles ont ensuite été déposés dans l'arène expérimentale (Fig. 20), celle-ci étant constituée d'une boîte ronde en plastique (95 mm de diamètre x 62 mm de hauteur) séparée en deux zones égales. Un morceau de ruban adhésif double-face maintenait le papier contenant chaque chenille des deux espèces de chaque côté de l'arène. Une femelle parasitoïde *Campoplex capitator* (Hymenoptera : Ichneumonidae), parasitoïde qui parasite le plus fréquemment les vers de la grappe, a ensuite été introduite dans l'arène durant 30 min en fin de journée, période d'activité des femelles. Les femelles parasitoïdes étaient issues de chenilles d'*Eudémis* récoltées sur le terrain (Perpignan, France). Chaque arène a été fermée par un couvercle en plastique percé de trous pour la circulation de l'air.



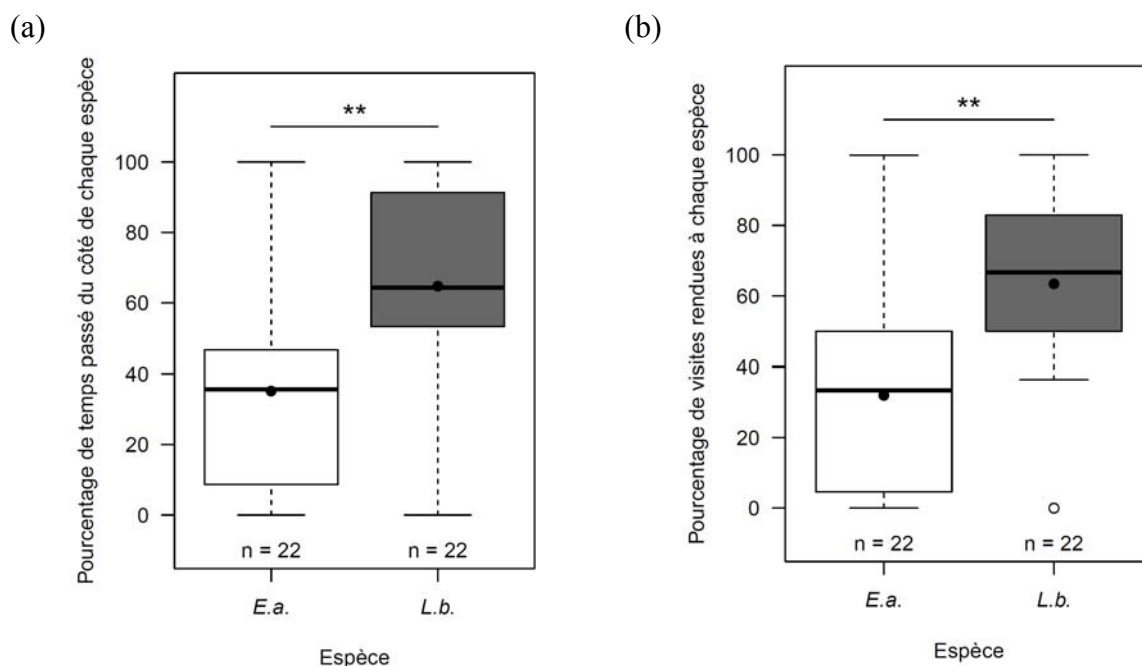
**Figure 20 :** Schéma de l'arène expérimentale utilisée pour la réalisation des tests de choix de la femelle *C. capitator*. Le cercle noir délimite la boîte ; la ligne du milieu, la limite entre les zones de *Cochylis* et *Eudémis*. Les carrés blancs striés représentent les papiers gaufrés contenant *Cochylis* (E.a. ; zone jaune) ou *Eudémis* (L.b. ; zone bleue).

Le chronomètre a été lancé dès le premier mouvement de la femelle parasitoïde. Le temps passé de chaque côté de l'arène (*Cochylis* versus *Eudémis*) a été pris en compte ainsi que le temps avant la première visite, le nombre de visites et l'espèce choisie (chenille piquée) par la femelle parasitoïde. Chaque répétition de l'expérience a été effectuée dans une arène différente afin que les odeurs des précédents individus n'influencent pas le choix de la femelle parasitoïde.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 2.11.1), à un seuil de significativité  $\alpha = 0.05$ . L'influence de l'espèce sur le temps passé de chaque côté par la femelle ainsi que le nombre de visites rendues à chaque chenille ont été testés à l'aide de tests t-pairés, les données étant distribuées normalement. Le choix de la femelle a été mis en évidence grâce à un test du  $\chi^2$  de Pearson.

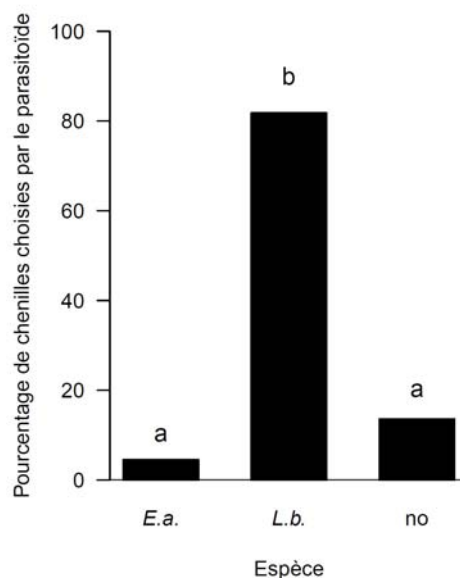
## Résultats

Les femelles parasitoïdes passent significativement plus de temps du côté du papier contenant la chenille d'Eudémis que celui contenant Cochylis (test t-pairé :  $t = 2.42$  ;  $p = 0.02$  ; Fig. 21a). De même, elles rendent plus de visites à Eudémis qu'à Cochylis avec, en moyenne, 63 % de visites rendues à Eudémis contre 32 % de visites rendues à Cochylis (test t-pairé :  $t = 2.82$  ;  $p = 0.01$  ; Fig. 21b).



**Figure 21 :** (a) Pourcentage de temps passé par la femelle parasitoïde *C. capitator* du côté de Cochylis (*E.a.*) et Eudémis (*L.b.*). (b) Pourcentage de visites rendues par la femelle parasitoïde *C. capitator* à Cochylis (*E.a.*) et Eudémis (*L.b.*). Les bords des rectangles représentent les premiers et troisièmes quartiles, les traits centraux les médianes ; les moyennes sont représentées par des ronds noirs et les maxima et minima par traits pointillés. Les « n » indiquent le nombre de femelles parasitoïdes testées. \*\*  $p = 0.01$ .

Enfin, l'espèce de chenille présente dans le papier gaufré influence significativement le choix de ponte de la femelle parasitoïde (test du  $\chi^2$  de Pearson :  $\chi^2 = 37.50$   $p < 0.0001$  ; Fig. 22). Quatre-vingt deux pourcents des femelles parasitoïdes ont piqué les chenilles d'Eudémis contre 4 % pour celles de Cochylis ; 14 % des femelles n'ont pas fait de choix durant les 30 min de l'expérience.



**Figure 22 :** Pourcentage de chenilles *Cochylis* (E.a.) ou *Eudémis* (L.b.) choisies par la femelle parasitoïde *C. capitator*. « no » signifie qu'elle n'a pas fait de choix. Une même lettre présente au-dessus des barres d'histogramme indique que les groupes ne sont pas significativement différents après un test a posteriori de Student ( $p > 0.05$ ).

#### IV. DISCUSSION DU CHAPITRE

L'objectif de ce cinquième chapitre était d'évaluer et de comparer l'investissement de chacune des deux espèces de vers de la grappe dans les différentes barrières de défenses afin de relier ces mesures au succès de parasitisme des parasitoïdes, en populations naturelles, ainsi qu'au choix de ponte effectué par les femelles parasitoïdes. Ainsi, nous avons clairement montré que les chenilles des deux espèces n'investissaient pas de la même manière dans leurs défenses. *Cochylis* semblait investir davantage dans les défenses morphologiques, avec une peau plus épaisse et plus dure, que dans les défenses comportementales. *A contrario*, *Eudémis* investirait plus dans les défenses comportementales que physiques, avec notamment une activité et des débattements nettement plus importants. Les résultats de l'investissement dans les défenses physiologiques via le système immunitaire étaient moins contrastés. *Eudémis* possédait une immunité basale (activités PO et PO-totale) plus importante que *Cochylis*. Cependant, *Cochylis* répondait à une stimulation immunitaire par une forte augmentation de ses paramètres immunitaires tandis que les paramètres immunitaires des chenilles d'*Eudémis* restaient stables.

Enfin, la population naturelle de chenilles d'*Eudémis* est plus parasitée que celle de *Cochylis* se développant sur un même cépage, dans un même vignoble. Ce succès de parasitisme nettement plus important chez les chenilles d'*Eudémis* que *Cochylis* peut en

partie s'expliquer par la préférence de ponte des femelles parasitoïdes, mise en évidence en laboratoire. En effet, en condition de choix, les femelles *Campoplex capitator* préfèrent clairement les chenilles d'Eudémis.

Malgré une aire de répartition septentrionale commune, Eudémis affectionne les climats chauds et secs tel que le pourtour méditerranéen tandis que *Cochylis* préfère les climats frais et humides. Ainsi, outre le cortège d'ennemis naturels communs aux deux espèces, celles-ci doivent également faire face à des ennemis naturels propres à leur distribution. Le pourtour méditerranéen est une zone propice aux parasitoïdes, contrairement au Nord de la France. L'enzyme PO est, en partie, responsable de la lutte contre les parasitoïdes *via* l'encapsulation. La présence importante de cette enzyme chez Eudémis pourrait avoir été sélectionnée en réponse à la forte présence de parasitoïdes dans son aire de répartition. Au contraire, *Cochylis* vit dans des zones humides propices au développement bactérien. La réponse prononcée de *Cochylis* au challenge bactérien peut donc être expliquée par la forte présence de bactéries sur les baies de raisin. De précédents travaux ont montré que certains mécanismes de défenses sont plutôt orientés contre des prédateurs et d'autres plutôt contre des parasitoïdes (Gentry and Dyer 2002; Barbosa and Caldas 2007; Smilanich et al. 2009). De plus, beaucoup de traits de défenses peuvent être efficaces contre les prédateurs et dans le même temps inefficaces contre les parasitoïdes (Gross 1993). *Cochylis* et Eudémis pourraient donc avoir un investissement dans les différentes barrières de défenses propres aux ennemis naturels qu'ils rencontrent. Une étude en populations naturelles visant à lister les ennemis naturels présents dans les vignobles où les deux espèces vivent en sympatrie, mais aussi les vignobles où elles vivent seules, nous permettrait de mieux comprendre l'investissement de chaque espèce dans les différentes barrières de défenses.

Quant aux parasitoïdes tel que *C. capitator*, ils sont connus pour être particulièrement discriminants vis-à-vis de leur hôte (Vinson 1998). En effet, les guêpes parasitoïdes perçoivent une large gamme de stimuli, aussi bien visuels, chimiques que vibratoires (Vinson 1998; Meyhofer and Casas 1999). Le succès de l'oviposition va dépendre de la qualité de l'hôte. Ainsi les stimuli perçus par la femelle parasitoïde semblent être plus favorables à l'oviposition lorsqu'il s'agit d'Eudémis. La peau de *Cochylis* étant plus épaisse, elle pourrait être beaucoup plus difficile à transpercer par l'ovipositeur de la femelle. Néanmoins, il est nécessaire de garder une certaine réserve sur ce résultat. Les parasitoïdes utilisés pour les tests de choix ont émergé de chrysalides d'Eudémis. Il est donc possible que les femelles

parasitoïdes pondent préférentiellement leurs œufs dans une chenille appartenant à l'espèce dont elles sont originaires, comme prédit par la théorie de « l'effet Hopkins ». En effet, l'étude des préférences de l'adulte pour un type d'habitat montre de façon certaine que le choix de l'hôte peut être modifié de manière importante par l'endroit où l'individu a effectué son développement larvaire. Ainsi, la femelle parasitoïde émergeant d'une Eudémis pondra préférentiellement son œuf dans une chenille d'Eudémis (Thiéry and Moreau 2013).

Cochylis et Eudémis auraient donc un investissement dans les différentes barrières de défenses propres aux ennemis naturels qu'ils rencontrent. Toutefois, Eudémis semble plus sensible aux parasitoïdes que Cochylis. Afin de confirmer ces résultats, il serait important de faire des tests de choix avec des parasitoïdes issus de Cochylis, ainsi que voir les défenses des deux espèces face à une infection bactérienne.

Ces résultats pourraient également avoir une implication dans la lutte biologique visant à réduire et contrôler les populations de vers de la grappe. En effet, au vu de nos résultats, les méthodes de lutte biologique pourraient s'avérer différentes ou du moins avoir un succès différent selon l'espèce visée, Cochylis versus Eudémis. Par exemple, l'utilisation des lâchers de parasitoïdes larvaires contre Eudémis, méthode jusqu'à présent ignorée, pourrait représenter une bonne alternative à la lutte chimique. Les chenilles d'Eudémis semblent plus sensibles aux parasitoïdes et ne répondent pas aux challenges immunitaires. En réalisant d'importants lâchers de parasitoïdes larvaires, la régulation des populations d'Eudémis pourrait être plus efficace qu'avec des lâchers de parasitoïdes d'œufs, dont l'efficacité est très variable. En revanche, cette méthode pourrait s'avérer moins efficace contre les chenilles de Cochylis dont la peau est plus épaisse et qui sont moins parasitées qu'Eudémis. Augmenter le nombre de lâchers pourrait contrer ce problème.

Cette étude montre clairement qu'il est important d'étendre nos connaissances sur les relations tri-trophiques entre la plante hôte, l'insecte ravageur et ses ennemis naturels afin de fournir des informations essentielles nous permettant d'améliorer les contrôles des populations de ravageurs.



---

## DISCUSSION GENERALE

---

## DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ma thèse était d'étudier la modulation du système immunitaire d'un ravageur par les pressions de sélection que sont la plante hôte (régulation ascendante) et les ennemis naturels (régulation descendante), en prenant l'exemple des interactions entre la vigne avec ses différents cépages, les tordeuses de la vigne, Eudémis (*Lobesia botrana*) et Cochylis (*Eupoecilia ambiguella*), et leurs parasitoïdes.

Au cours d'études précédentes, l'influence du cépage de vigne sur différents traits d'histoire de vie d'Eudémis a été mis en évidence (Moreau et al. 2006b; Moreau et al. 2006a; Moreau et al. 2006c; Moreau et al. 2007). L'ensemble de ces études a démontré sans équivoque que le cépage où la chenille effectuait son développement avait une forte influence sur l'ensemble des traits d'histoire de vie des individus. Par exemple, le temps de développement des chenilles ainsi que la taille des œufs pondus et la proportion d'œufs éclos dépendent fortement du cépage de vigne (Moreau et al. 2006b; Moreau et al. 2006a; Moreau et al. 2006c; Moreau et al. 2007). Parallèlement, d'autres études réalisées par les mêmes auteurs ont également montré que le taux de parasitisme des œufs d'Eudémis dépendait du cépage où s'étaient développés leurs parents (Moreau et al. 2009). De même, le succès de parasitisme des parasitoïdes larvaires d'Eudémis dépend du cépage où les chenilles effectuent leur développement (Moreau et al. 2010). Ces deux études s'accordent donc à montrer un fort impact du cépage sur les parasitoïdes sans toutefois en expliquer les mécanismes responsables.

Afin de comprendre l'implication de plante hôte sur les probabilités d'une larve de phytophage à être parasitée, en fonction du cépage où elle effectue son développement, nous nous sommes appuyés sur une nouvelle hypothèse récemment apparue dans la littérature. Cette hypothèse propose une implication de la plante hôte dans le système de défenses des phytophages ce qui expliquerait les variations de succès de parasitisme *in natura*. Le système de défenses des insectes phytophages contre leurs ennemis naturels est basé sur une série de barrières défensives, comportementales et morphologiques, mais aussi *in fine* par l'intervention du système immunitaire. Une fois victime d'un parasitoïde, l'insecte phytophage ne doit sa survie qu'à son système immunitaire. Il se pourrait alors que la variabilité de la qualité de la plante hôte affecte l'efficacité des défenses immunitaires des insectes phytophages contre les parasitoïdes. Dans cette continuité, l'hypothèse avancée afin

d'expliquer les résultats obtenus dans les études précédentes était que le cépage de vigne modulerait le système immunitaire des tordeuses de la vigne, agissant ainsi sur leur capacité à se défendre contre les parasitoïdes.

Ma discussion s'articulera autour de deux points. La première partie plus axée recherche sur la fondamentale, portera sur les pressions de sélections modulant l'immunité. La seconde partie donnera une vision plus appliquée de ma thèse.

## **I. LES PRESSIONS DE SELECTIONS MODULANT L'IMMUNITE DES VERS DE LA GRAPPE**

Dans le premier chapitre, nous avons montré que le cépage de vigne modulait l'immunité des vers de la grappe, Eudémis et Cochylis, qu'ils soient issus de populations naturelles ou d'une souche consanguine maintenue en laboratoire. De plus, nous avons observé un compromis plastique entre les voies immunitaires constitutives (concentration en hémocytes et activité du système PO-PPO) et induites (activité antimicrobienne), modulé par le cépage de vigne. Par exemple, les chenilles élevées sur du Gewürztraminer investissaient davantage dans les hémocytes et l'activité du système PO-PPO contrairement aux chenilles issues des autres cépages testés qui investissaient plus dans l'activité antimicrobienne (Vogelweith et al. 2011). Ce compromis entre l'activité du système PO-PPO et l'activité antimicrobienne a déjà été observé dans plusieurs études intégrant la nutrition des insectes phytophages (Freitak et al. 2007; Moret and Schmid-Hempel 2009; Povey et al. 2009; Cotter et al. 2011). Même si les progrès récents en génomique fonctionnelle et en biologie moléculaire ont considérablement élargi notre compréhension des mécanismes immunitaires permettant aux insectes de se défendre contre leurs ennemis naturels (Ponton et al. 2013), les études sur le sujet s'accordent à dire que l'origine du compromis entre ces deux voies immunitaires n'est pas clairement établi. A l'heure actuelle, la question est de savoir si les différentes voies immunitaires partagent ou non les mêmes besoins nutritionnels, et ainsi s'ils sont en concurrence pour les ressources limitées de leur hôte (Ponton et al. 2013). Dans leur étude sur la chenille légionnaire africaine (*S. exempta*), Povey et ses collaborateurs (2009) ont montré que lorsque le ratio Protéines/Glucides (P:G) est élevé, l'hémolymphe des chenilles contenait une forte activité antimicrobienne mais une faible activité PO. Outre la compétition pour une même ressource entraînant l'expression d'un paramètre au dépend de l'autre, il est également possible que les différents paramètres immunitaires nécessitent différents optima nutritionnels. En effet, c'est ce qui a été mis en évidence par Cotter et al. (2011) sur les

chenilles de la Noctuelle méditerranéenne (*S. littoralis*). En nourrissant les chenilles avec 20 diètes différentes contenant différents ratio de P:G (voir Fig. 4 de l'introduction générale), les auteurs ont démontré que les paramètres immunitaires, tels que l'activité PO et l'activité des lysozymes, ne requièrent pas les mêmes optima nutritionnels. Ils ont également montré que ces optima différaient selon le statut infectieux de la chenille et le paramètre immunitaire considéré. Ainsi les auteurs avancent que les insectes pourraient potentiellement ajuster leur choix alimentaire afin de parvenir à un équilibre nutritif qui répond le mieux aux infections rencontrées (Cotter et al. 2011).

Outre les ressources requises au bon fonctionnement du système immunitaire, de nombreux facteurs peuvent expliquer ce compromis modulé par le cépage de vigne. En effet, dès l'éclosion les insectes phytophages ingèrent une vaste quantité de nourriture et ce jusqu'à la mue nymphale (Gotthard 2004). En plus du matériel végétal consommé par les chenilles, elles s'alimentent également de tous les microorganismes présents à la surface et à l'intérieur des baies de raisin (Freitak et al. 2007; Barata et al. 2012), s'exposant naturellement à de fortes concentrations de microbes. En ingérant ces micro-organismes, le système immunitaire des chenilles peut être activé et modulé selon la présence/absence des microbes ingérés, leur virulence, leur quantité etc. (Freitak et al. 2007). Freitak et al. (2007) ont, par exemple, montré qu'une diète enrichie en bactéries augmente l'activité lytique des chenilles de la Noctuelle du chou (*Trichoplusia ni*) et réduit leur activité PO par rapport aux chenilles issues de la diète sans bactérie. Ainsi, cette étude révèle clairement que les défenses immunitaires des insectes phytophages peuvent être affectées à la fois par la plante hôte mais aussi par la consommation de microbes se développant à la surface ou à l'intérieur de leur nourriture. Toutefois, chaque plante hôte ou diète possède son propre cortège de micro-organismes qui sont en interaction les uns avec les autres, mais aussi avec les composés de la plante hôte. La vigne et ses baies de raisins n'y font pas exception.

La surface mais aussi l'intérieur des baies de raisin regorgent de micro-organismes en tout genre, allant des bactéries aux levures, en passant par les champignons (Boe 2005), le tout modulé par les conditions climatiques ou encore les traitements viticulturaux (Barata et al. 2012). Il est donc évident que les baies de raisin, elles aussi, se défendent contre ces pathogènes. Les peptides antimicrobiens (ou AMPs) sont produits, par les baies de raisin, constitutivement ou suite à une infection (Visser 2011) et éliminent un large éventail de pathogènes. Tout comme l'immunité des insectes, l'immunité des baies de raisin semble variable, certains cépages étant plus sensibles que d'autres aux infections. Par exemple, les

cultures de Chardonnay, en Afrique du Sud, sont très sensibles au développement de la galle du collet (Burr et al. 1998), tandis que le Pinot Noir possède un gène spécifique de défensines (de Beer and Vivier 2008), un peptide antifongique de la vigne, lui procurant une résistance plus importante contre les champignons. Le système immunitaire de la vigne diffère donc d'un cépage à l'autre impactant ainsi le cortège bactérien qui s'y développe. Les chenilles qui se nourrissent des baies de raisin seront donc confrontées à un cortège de micro-organismes variable, qui peut ainsi moduler différemment leur immunité.

Ainsi, nous avons émis deux hypothèses non exclusives pour expliquer le compromis observé entre les voies constitutives et induites. La première était que les baies de raisin de certains cépages pourraient réduire/inhiber la croissance bactérienne à la surface et à l'intérieur du fruit, modulant l'investissement immunitaire des chenilles qui s'y nourrissent (Vogelweith et al. Annexe 3). Les chenilles se développant sur des baies où le cortège bactérien est réduit, n'auront pas à investir dans leur activité antimicrobienne et pourront investir davantage dans leur activité du système PO-PPO (Freitak et al. 2007; Moret and Schmid-Hempel 2009; Povey et al. 2009; Cotter et al. 2011). La seconde hypothèse était que les baies des différents cépages sont de qualités nutritionnelles variables, la composition de ces baies pourrait donc moduler l'investissement dans les différentes voies immunitaires (Ponton et al. 2011). Notre étude s'est juste focalisée sur la première hypothèse tout en gardant des diètes enrichies en baies de raisin comme contrôle de la seconde hypothèse. Les résultats obtenus réfutent cette première hypothèse. En effet, l'ingestion de diètes artificielles enrichies en bactéries ou en antibiotiques n'affecte pas les paramètres immunitaires des chenilles de *Cochylis*. Aucun compromis entre les voies constitutives et induites n'a donc pu être mis en évidence chez les chenilles s'alimentant sur ces diètes artificielles enrichies en bactéries ou avec différentes concentrations de tétracycline. Toutefois, le compromis a été confirmé par les chenilles qui se sont développées sur les diètes artificielles enrichies en baies de Chardonnay ou Pinot Noir. Les chenilles élevées sur du Pinot Noir investissaient davantage dans la voie constitutive (concentration en hémocytes et activité du système PO-PPO) que dans la voie induite (activité antimicrobienne) tandis que les chenilles élevées sur du Chardonnay investissaient plus dans la voie induite et moins dans la voie constitutive. Il semble donc que ce compromis soit plutôt dû à la présence (ou l'absence) d'un ou plusieurs composés clés dans les baies de certains cépages, et non pas dû à la présence/absence de micro-organismes. Quels pourraient donc être ces composés clés ?

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires les plus abondants chez les plantes (Conde et al. 2007). Dans les baies de raisin, ces composés sont principalement présents dans la peau, partie de la baie attaquée en premier lieu par les vers de la grappe, et dans les pépins (Conde et al. 2007). De plus, de précédentes études ont montré que la concentration en composés phénoliques dans les baies dépend fortement du cépage de vigne, mais aussi des pratiques viticultrices et des facteurs environnementaux (Conde et al. 2007; Zhu et al. 2012). Par exemple, Zhu et al. (2012) ont démontré que la concentration en flavonols était plus importante dans les baies des cépages Syrah, Cabernet Sauvignon et Merlot que dans les baies de Gamay et de Pinot Noir. Etant donné les variations au sein d'un seul composé, ici les flavonols, il est prévisible que d'autres composés des baies soient également très variables entre les différents cépages. Dans une étude récente sur le Sphinx du tabac (*Manduca sexta*), del Campo et al. (2013) ont mis en évidence que les chenilles se nourrissant d'une diète supplémentée en acide chlorogénique (un ester de l'acide caféique) avaient une concentration en hémocytes plus importante et une meilleure résistance aux infections bactériennes que les chenilles se nourrissant d'une diète non supplémentée. Or, l'acide caféique est impliqué dans la biosynthèse des composés phénoliques dans les baies de raisin (Conde et al. 2007) et est connu pour être un agent antimicrobien très efficace (Almeida et al. 2006). Il pourrait être impliqué dans les variations immunitaires des chenilles. Il serait donc primordial, dans de futures études, d'identifier les composés des baies de raisin, propre à chaque cépage. En identifiant les composés présents dans les baies, à l'aide d'HPLC ("High-performance liquid chromatography") par exemple, nous serions à même de savoir quels composés sont ingérés et stockés par les chenilles, en fonction des cépages où elles effectuent leur développement. Suite à l'identification de ces composés clefs, des études au laboratoire, à l'instar de del Campo et ses collaborateurs (2013), consistant à supplémenter des diètes artificielles avec ces composés cibles nous permettraient de tester leurs répercussions sur l'immunité des vers de la grappe.

Notre étude montre donc clairement une forte influence du cépage de vigne sur l'immunité des tordeuses de la vigne, qu'elles soient issues de populations naturelles ou de souches consanguines élevées en laboratoire. De plus, le cépage modulerait le compromis entre les voies constitutives et induites du système immunitaire sur la souche consanguine. Cependant, ce compromis entre voies constitutives et induites n'est pas retrouvé en populations naturelles. Contrairement aux prédictions de la théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie qui avancent un compromis entre les différentes fonctions, les paramètres

immunitaires testés que sont la concentration en hémocytes, l'activité du système PO-PPO et l'activité antimicrobienne sont corrélés positivement. Avec leur article accrocheur « Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction », Reznick et ses collaborateurs (2000) pointent l'importance de l'interaction entre la génétique et l'environnement. En effet, notre expérience en laboratoire observant le compromis entre les différentes voies immunitaires a été réalisée sur une souche de chenilles consanguines, nous permettant de traiter uniquement une variable environnementale (le cépage de vigne). Cependant, chaque population naturelle possède une variabilité génétique grâce à laquelle certains individus seront favorisés dans un environnement particulier (Reznick et al. 2000). Par exemple, dans une population du Sud de la France, avec une pression de parasitisme forte, des températures plus importantes favorisant le développement des micro-organismes, les chenilles auront une forte concentration en hémocytes et beaucoup d'activité PO-PPO (Vogelweith et al. Annexe 4). La présence de micro-organismes pourra également induire une activité antimicrobienne très importante chez les chenilles, qui auront ainsi tous leurs paramètres immunitaires rehaussés, masquant le compromis entre les différentes voies immunitaires.

La régulation ascendante, par la plante hôte, n'est pas la seule pression environnementale à laquelle sont soumises les chenilles. Les ennemis naturels, et notamment les parasitoïdes, agissent également dans la modulation des paramètres immunitaires des chenilles. Notre étude réalisée en populations naturelles (Vogelweith et al. Annexe 4 et 5) nous a permis de mettre en évidence cette régulation descendante sur l'immunité des vers de la grappe.

Lors du suivi de différentes populations naturelles, nous avons montré que les paramètres immunitaires des chenilles d'Eudémis mais aussi le succès de parasitisme est variable selon les populations rencontrées (Vogelweith et al. Annexe 4). En accord avec nos résultats, de précédentes études ont montré que la capacité de la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*) à encapsuler des œufs de parasitoïdes et à résister à une infection fongique était variable géographiquement (Kraaijeveld and Vanalphen 1995; Tinsley et al. 2006), suggérant une adaptation locale du système immunitaire à l'abondance et la virulence des ennemis naturels (Kalbe and Kurtz 2006; Cornet et al. 2009). Ainsi, grâce aux 26 populations échantillonnées dans six régions viticoles de France, nous avons obtenu une relation positive entre les paramètres immunitaires des populations d'Eudémis et le succès de parasitisme dans ces mêmes populations. Les populations les plus immunocompétentes étaient les populations les plus parasitées, et cela quelque soit le paramètre immunitaire

considéré. Cette relation positive entre immunité et parasitisme nous invite à nous intéresser aux mécanismes responsables de cette corrélation. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette relation.

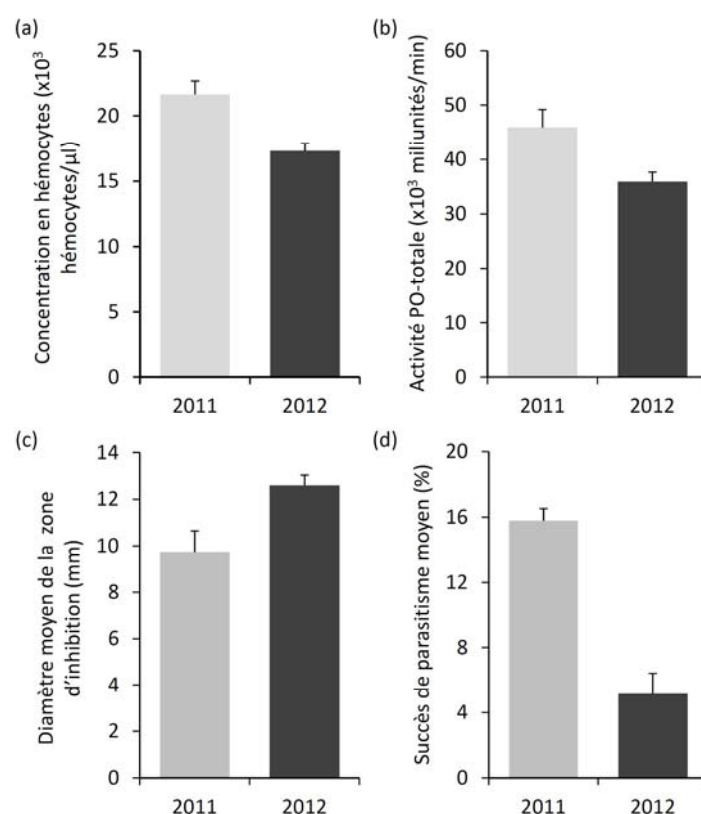
La première hypothèse proposait une réponse plastique des chenilles au parasitisme qui augmenterait leur immunité dès la perception des parasitoïdes. Dans une précédente étude, nous avons montré que les chenilles d'Eudémis accéléraient leur développement et atteignaient la mue nymphale plus rapidement en réponse aux signaux du parasitoïde (Vogelweith et al. 2013a). Ce changement phénotypique, induit par la présence du parasitoïde, indique que les chenilles sont capables de percevoir les parasitoïdes avant qu'il y ait contact entre les deux protagonistes. De la même façon, les chenilles pourraient détecter la présence des parasitoïdes précocement et ajuster leur investissement dans l'immunité en fonction du risque d'infection potentielle. Afin de répondre à notre hypothèse, nous avons exposé des chenilles d'Eudémis à des parasitoïdes pendant six jours, à la suite desquels les paramètres immunitaires ont été évalués. Bien que les chenilles aient la capacité de percevoir les parasitoïdes dans leur environnement (Vogelweith et al. 2013a), elles n'augmentent pas leur immunité pour autant. Cette première hypothèse d'augmentation plastique de l'immunité, en présence de parasitoïdes, semble donc être réfutée par nos expériences. Cette absence d'augmentation des paramètres immunitaires des chenilles d'Eudémis face à un parasitoïde est cohérent avec une autre étude réalisée au cours de ma thèse. En effet, nous avons montré que les paramètres immunitaires des chenilles d'Eudémis n'augmentaient pas en réponse à une injection de bactéries inactives (Vogelweith et al. Annexe 6). Ces résultats suggèrent que les paramètres immunitaires des chenilles d'Eudémis ne sont pas plastiques et restent à un niveau basal quelque soit l'origine de la stimulation.

La seconde hypothèse émise pour expliquer cette corrélation positive entre immunité et parasitisme avançait une sélection des défenses immunitaires des chenilles par la pression de parasitisme. Ainsi, les populations caractérisées par une forte pression de parasitisme seraient soumises à une pression de sélection favorisant les individus les plus immunocompétents. Par exemple, Bryan-Walker et ses collaborateurs (2007) ont montré, chez l'amphipode *Paracalliope novizealandiae* que les populations n'ayant jamais été exposées à une infection par des trématodes, résistaient moins aux infections que les populations régulièrement exposées. De même, les populations de Grillons (*Gryllus integer*) soumises à de forts risques de prédation et de parasitisme ont une réponse d'encapsulation plus importante que les populations de Grillons soumis à un faible risque de prédation et de

parasitisme (Kortet et al. 2007). En raison des coûts associés à l'immunité mais aussi ceux liés à l'infection par un parasite, la sélection naturelle devrait optimiser l'investissement immunitaire selon la prévalence locale et la sévérité de l'infection (Kalbe and Kurtz 2006). Sous ces conditions, la sélection naturelle devrait favoriser une baisse de l'immunocompétence dans les populations soumises à de faibles pressions parasitaires, populations ne payant pas le coup de l'infection (Kalbe and Kurtz 2006). En accord avec ce résultat et ces prédictions, nous avons mis en évidence une relation positive entre les paramètres immunitaires, notamment la concentration en hémocytes, et l'indice de succès de parasitisme dans les neuf populations suivies durant cinq années. Ces résultats nous permettent de trancher en faveur d'une sélection de l'immunité des chenilles d'Eudémis. Années après années, la forte présence de parasitoïdes dans certains vignobles a dû sélectionner les chenilles les plus résistantes aux parasitoïdes entraînant une augmentation des paramètres immunitaires dans ces mêmes populations. Afin de confirmer ce résultat, l'échantillonnage d'un plus grand nombre de populations ainsi que des mesures de différenciations génétiques entre les populations semblent indispensables.

La théorie d'évolution des traits d'histoire de vie prédit que l'immunité est coûteuse et impose des compromis dans la répartition des ressources entre les différentes fonctions essentielles (Sheldon and Verhulst 1996). En effet, dans notre étude réalisée sur les populations naturelles d'Eudémis (Vogelweith et al. Annexe 4), nous avons observé que les populations les plus immunocompétentes étaient les populations dont les individus étaient les plus petits. Chez de nombreuses espèces d'insectes phytophages, la taille des adultes (dépendant de la taille des larves) est corrélée positivement à la fécondité (Tammaru et al. 2002). Eudémis ne fait pas exception à la règle (Moreau et al. 2006c). Dans leur étude, Gwynn et al. (2005) ont mis en évidence un compromis entre la capacité de résistance à une attaque de parasitoïde et la fécondité chez le puceron vert du pois (*Acyrtosiphon pisum*). L'investissement immunitaire a donc un coût en terme de fitness puisque les individus investissant dans leur immunité sont plus petits et par conséquent ne pourront investir autant dans la fécondité. Il est donc prévisible que les populations les moins sujettes au parasitisme investissent moins dans l'immunité, au profit d'une plus forte fécondité. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'élever des chenilles d'Eudémis, en laboratoire, sur une même diète artificielle, et de les soumettre à différentes pressions de parasitisme pendant plusieurs générations, et ainsi vérifier à chaque génération l'évolution des paramètres immunitaires et de la fécondité.

Afin d'exposer plus concrètement la modulation de l'immunité des chenilles d'Eudémis par les parasitoïdes, en populations naturelles, nous avons comparé visuellement les paramètres immunitaires des chenilles saines, cépages et vignobles confondus, en 2011 et 2012 (Fig. 23). En 2011, la pression de parasitisme moyenne (Fig. 23d) était trois fois plus élevée qu'en 2012. Cette même année (2011), les effecteurs de la voie constitutive (hémocytes et système PO-PPO ; Fig. 23a et b), employés pour la lutte contre les parasitoïdes, étaient également élevées, contrairement à l'activité antimicrobienne (Fig. 23c). En revanche, en 2012, les chenilles avaient moins d'hémocytes et d'enzymes PO mais plus d'activité antimicrobienne (Fig 23). L'activité antimicrobienne, étant un effecteur inductible, les chenilles récoltées en 2012, année pluvieuse, ont dû être en contact avec des micro-organismes qui ont stimulé la voie induite de leur immunité. Outre le compromis entre les voies constitutives et induites, ces observations illustrent la modulation de l'immunité des chenilles d'Eudémis par les ennemis naturels présents dans l'environnement.



**Figure 23 :** Graphiques représentant (a) la concentration en hémocytes, (b) l'activité PO-totale et (c) l'activité antimicrobienne dans l'hémolymph des chenilles récoltées ainsi que le succès de parasitisme moyen en 2011 (gris clair) et 2012 (gris foncé).

Les expériences réalisées au cours de ma thèse nous ont donc permis de souligner l'importance d'intégrer le système immunitaire des insectes phytophages dans l'étude des

interactions tri-trophiques. Le système immunitaire des chenilles d'Eudémis n'est pas seulement modulé par le cépage de vigne, il dépend également de la pression de parasitisme, expliquant les variations observées dans les populations naturelles d'Eudémis en France.

## **II. IMPLICATIONS DE L'IMMUNITÉ DANS LA LUTTE BIOLOGIQUE**

De par les nombreux dommages qu'elles causent dans les vignobles européens, les Tordeuses de la vigne, *Cochylis* et *Eudémis*, font partie des principaux ravageurs de la vigne. Suite aux effets néfastes de la lutte chimique contre les ravageurs, les recherches se tournent de plus en plus vers la lutte biologique. Cependant, les résultats souvent infructueux et inexplicables des lâchers de parasitoïdes posent de nombreuses questions. Dans le cadre de ma thèse, nous avons pu apporter quelques réponses aux questions soulevées par le manque de succès de la lutte biologique engagée contre les vers de la grappe.

La gestion des ravageurs et des maladies dans les cultures continue à être un défi très important pour la communauté agricole. Aujourd'hui, on estime que plus de dix mille espèces d'insectes causent des dommages aux cultures mondiales. Afin de réduire et contrôler les populations de Tordeuses et ainsi diminuer les pertes qu'elles occasionnent, de nombreuses méthodes de lutte ont été développées. La lutte chimique a été la première mise en œuvre pour lutter contre les vers de la grappe. Une large gamme de produits est homologuée contre ces ravageurs. En 2004, environ 1 300 tonnes de matières actives ont été utilisées en Europe et au Moyen-Orient contre les ravageurs de la vigne (Thiéry 2008). Actuellement, deux grandes familles d'insecticides sont utilisées pour faire face aux ravageurs. Les premiers sont les régulateurs de croissance qui perturbent la synthèse de chitine indispensable à la mue de l'insecte. Les seconds sont des neurotoxiques qui bloquent le fonctionnement des synapses de l'individu (Thiéry 2008).

Compte tenu des effets négatifs des produits chimiques et des préoccupations environnementales grandissantes, de nombreux programmes, tel que « Ecophyto 2018 », sont mis en place afin de réduire l'utilisation des pesticides au profit de luttés alternatives. La lutte biologique fait partie de ces méthodes de lutte sur laquelle la communauté scientifique fonde beaucoup d'espoir. Elle consiste en l'utilisation des organismes bénéfiques, appelés auxiliaires ou ennemis naturels, dans le but de réduire et contrôler les populations de ravageurs (van Lenteren et al. 2006). Le nombre important d'ennemis naturels de Tordeuses de la vigne, notamment des parasitoïdes, ont rendu la lutte biologique plus abordable. Des

essais de lutte biologique par lâchers de Trichogrammes ont déjà été réalisés sur les œufs, entraînant une réduction des dégâts variant de 20 à 80% selon les essais et les sites (Barnay 1999). L'origine de cette variation dans le succès de la lutte biologique reste inconnue et suscite de nombreuses questions.

Suite aux études que nous avons menées lors de ma thèse, nous pouvons affirmer que le cépage de vigne module l'immunité des vers de la grappe. Il est donc important de considérer le cépage de vigne sur lequel une chenille effectue son développement afin de mettre en place des programmes de lutte biologique plus adaptés. Jusqu'à présent, les traitements, qu'ils soient chimiques ou biologiques, étaient utilisés de la même manière pour les deux espèces (Cochylis et Eudémis), raisonnant comme s'il ne s'agissait que d'une seule et même espèce. Or, la lutte biologique requière de solides connaissances sur les espèces visées ainsi que les pressions de sélection qui agissent sur elles (van Lenteren et al. 2006). Il est donc nécessaire de connaître les moyens de défenses des deux espèces ainsi que la modulation de ces défenses par la vigne. Cochylis et Eudémis n'investissent pas dans les mêmes moyens de défenses (Vogelweith et al. Annexe 6). Les chenilles de Cochylis possèdent une peau épaisse, plus résistante et donc plus difficile à transpercer. Elles sont également moins actives, mais répondent rapidement et efficacement à une stimulation bactérienne. Au contraire, les chenilles d'Eudémis qui ont une peau moins épaisse et moins résistante, ne répondent pas à une stimulation immunitaire mais sont très actives et se débattent vigoureusement. Malgré cet investissement propre à chaque espèce, les populations de chenilles d'Eudémis sont plus parasitées que les populations de Cochylis. De plus, ses moyens de défenses sont modulés par de nombreuses pressions de sélection. Le cépage de vigne, par exemple, module fortement le système immunitaire des chenilles de Cochylis (Vogelweith et al. 2011). Ainsi, les chenilles élevées sur du Gewürztraminer possèdent une forte concentration en hémocytes et une forte activité PO, suggérant une résistance plus importante aux parasitoïdes (Fellowes and Godfray 2000). A l'inverse, les chenilles élevées sur du Chasselas possèdent une faible concentration en hémocytes et une faible activité PO mais beaucoup d'activité antimicrobienne. Ces chenilles pourront donc être plus résistantes aux infections bactériennes (Haine et al. 2008). Il en est de même pour Eudémis, dont le système immunitaire des populations naturelles est influencé par le cépage de vigne (Vogelweith et al. Annexe 4). Outre l'effet du cépage de vigne, les conditions abiotiques modulent également l'immunité des Tordeuses. En effet, les populations d'Eudémis récoltées dans le Nord de la France, où la température est plus fraîche ont des paramètres immunitaires

globalement moins élevés que les populations récoltées au Sud où la température est plus chaude (Vogelweith et al. Annexe 4). Toutes ces connaissances peuvent expliquer le succès variable de la lutte biologique, mais peuvent également s'avérer utiles afin d'ajuster les programmes de lutte biologique dirigés contre les Tordeuses de la vigne.

Selon les cépages présents dans les vignobles mais aussi la région de France où ils sont situés, le système immunitaire des chenilles va être plus ou moins exprimé. Deux cas de figure sont alors envisageables. Dans la première situation, seule l'une des deux espèces est présente. Les populations de *Cochylis* sont plutôt situées au Nord de la France, avec des paramètres immunitaires peu élevés en raison des faibles pressions de parasitisme. Ainsi, une lutte biologique orientée vers un petit nombre de lâchers de parasitoïdes larvaires devrait permettre de réduire et contrôler les populations. Cependant, les chenilles de *Cochylis* répondent fortement aux stimulations immunitaires (Vogelweith et al. Annexe 1 et 6). Il est donc important de considérer ces différents aspects. Dans le cas des populations d'Eudémis, plutôt situées dans le Sud de la France, les fortes pressions de parasitisme favorisent les chenilles avec des paramètres immunitaires élevés. Le contrôle des populations à l'aide de lâchers de parasitoïdes larvaires devrait faire intervenir de plus nombreux lâchers. Par ailleurs, plus les populations seront au Sud, plus les parasitoïdes seront nombreux naturellement, impliquant que les ravageurs soient localement adaptés à cette forte pression de parasitisme avec un système immunitaire efficace (Chapitre IV). Dans ce contexte, plus de lâchers devront être envisagés afin d'espérer contrôler les populations de ravageurs. Un autre moyen de lutte biologique à l'aide de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (plus simplement appelée Bt) pourrait également être envisagé. Ainsi le Bt pourrait induire une forte activité antimicrobienne des chenilles, affaiblissant les défenses constitutives de celles-ci. Lâcher des parasitoïdes après un traitement au Bt permettrait d'optimiser l'efficacité des lâchers et réguler plus facilement la population d'Eudémis.

Dans la seconde situation où les deux espèces sont présentes dans le même vignoble, dans le Rhône-Alpes, la Champagne-Ardenne ou parfois la Bourgogne, les préférences des parasitoïdes pour les chenilles d'Eudémis font qu'il sera difficile de contrôler les populations de *Cochylis*.

Ces études montrent clairement qu'il est important d'étendre nos connaissances sur les relations tri-trophiques entre la plante hôte, l'insecte ravageur et ses ennemis naturels afin de fournir des informations essentielles nous permettant d'améliorer le contrôle des populations de ravageurs.

### **III. CONCLUSION**

Les différentes études réalisées dans le cadre de ma thèse confirment la complexité des relations tri-trophiques entre la plante hôte, l'insecte phytophage et ses ennemis naturels. L'intégration du système immunitaire de l'insecte phytophage semble primordiale dans la compréhension des interactions unissant les trois protagonistes. En effet, nous avons pu mettre en évidence à la fois une influence du cépage de vigne mais aussi des ennemis naturels sur la modulation de l'immunité des vers de la grappe. Ces résultats peuvent avoir des applications en termes de lutte biologique, comme exposé précédemment, mais permettent également de mieux comprendre les relations tri-trophiques et la régulation de ses communautés.

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamo SA (2004) How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Anim Behav* 68:1443-1449. doi:10.1016/j.anbehav.2004.05.005
- Adamo SA, Lovett MME (2011) Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Experimental Biology* 214 (12):1997-2004. doi:10.1242/jeb.056531
- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6 (4):562-565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986
- Almeida AAP, Farah A, Silva DAM, Nunan EA, Gloria MBA (2006) Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23):8738-8743. doi:10.1021/jf0617317
- Aquilino KM, Cardinale BJ, Ives AR (2005) Reciprocal effects of host plant and natural enemy diversity on herbivore suppression: an empirical study of a model tritrophic system. *Oikos* 108 (2):275-282. doi:10.1111/j.0030-1299.2005.13418.x
- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 47:817-844. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145300
- Balachowsky A, Mesnil L (1935) Insectes nuisibles à la vigne. *Polychrosis botrana* Schiff. (Lep. Tortricidae). In: Busson IP (ed) Les insectes nuisibles aux plantes cultivées, leur mœurs, leur destruction. pp 677-886
- Baldwin IT, Karban R (1997) Induced responses to herbivory. Chicago University Press, Chicago
- Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153 (3):243-259. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025
- Barbosa P, Caldas A (2007) Do larvae of species in macrolepidopteran assemblages share traits that influence susceptibility to parasitism? *Environmental Entomology* 36 (2):329-336. doi:10.1603/0046-225x(2007)36[329:dlosim]2.0.co;2

- Barnay O (1999) Dynamique des populations et relations hôte-parasite chez le couple *Lobesia botrana* Den. & Schi - *Trichogramma cacoeciae* Marchal, dans le cadre de la lutte biologique en vignoble. Université Pierre et Marie Curie
- Barnes AI, Siva-Jothy MT (2000) Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:177-182
- Benrey B, Denno RF (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: A test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78 (4):987-999. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[0987:tsghmh]2.0.co;2
- Boe SS (2005) Investigation of bacteria associated with Australian wine grapes using cultural and molecular methods. University of New South Wales, Sydney, Australia
- Bryan-Walker K, Leung TLF, Poulin R (2007) Local adaptation of immunity against a trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology* 152 (3):687-695. doi:10.1007/s00227-007-0725-x
- Bukovinszky T, Poelman EH, Gols R, Prekatsakis G, Vet LEM, Harvey JA, Dicke M (2009) Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immune defence of a herbivore against parasitism. *Oecologia* 160 (2):299-308. doi:10.1007/s00442-009-1308-y
- Burr TJ, Bazzi C, Sule S, Otten L (1998) Crown gall of grape - Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease* 82 (12):1288-1297. doi:10.1094/pdis.1998.82.12.1288
- Carton Y, Nappi AJ (2001) Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52 (3-4):157-164
- Cerenius L, Soderhall K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198:116-126. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- Charmillot P, Pasquier D, Remund U, Boller E (1996) Fiche technique sur les maladies et ravageurs en viticulture: vers de la grappe: cochyliis. *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture* 28 (1):41-42

- Clancy KM, Price PW (1987) Rapid herbivore growth enhances enemy attack - Sublethal plant defenses remain a paradox. *Ecology* 68 (3):733-737. doi:10.2307/1938479
- Coley PD, Bateman ML, Kursar TA (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos* 115 (2):219-228
- Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Geros H (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1 (1):1-22
- Cornet S, Biard C, Moret Y (2009) Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia* 159:257-269
- Cotter SC, Hails RS, Cory JS, Wilson K (2004) Density-dependent prophylaxis and condition-dependent immune function in Lepidopteran larvae: a multivariate approach. *Journal of Animal Ecology* 73 (2):283-293. doi:10.1111/j.0021-8790.2004.00806.x
- Cotter SC, Simpson SJ, Raubenheimer D, Wilson K (2011) Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits. *Functional Ecology* 25 (1):186-198. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01766.x
- Danchin E, Giraldeau L-A, Cézilly F (2008) *Behavioral Ecology*, pp.727-758. Oxford: Oxford University Press
- de Beer A, Vivier MA (2008) Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *Bmc Plant Biology* 8. doi:10.1186/1471-2229-8-75
- del Campo ML, Halitschke R, Short SM, Lazzaro BP, Kessler A (2013) Dietary plant phenolic improves survival of bacterial infection in *Manduca sexta* caterpillars. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 146 (3):321-331. doi:10.1111/eea.12032
- Delbac L, Lecharpentier P, Thiéry D (2010) Larval instars determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Protection* 29:623-630
- Di Giulio M, Edwards PJ (2003) The influence of host plant diversity and food quality on larval survival of plant feeding heteropteran bugs. *Ecological Entomology* 28 (1):51-57. doi:10.1046/j.1365-2311.2002.00488.x

- Diamond SE, Kingsolver JG (2011) Host plant quality, selection history and trade-offs shape the immune responses of *Manduca sexta*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 278 (1703):289-297. doi:10.1098/rspb.2010.1137
- Dicke M, Baldwin IT (2010) The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* 15 (3):167-175. doi:10.1016/j.tplants.2009.12.002
- Dixon AFG (1970) Quality and availability of food for a sycamore aphid population. In: Watson A (ed) *Animal populations in relations to their food resources* Blackwell Scientific, Oxford, pp 271-287
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 135 (4):1893-1902. doi:10.1104/pp.104.049981
- Dyer LA, Letourneau DK (1999) Trophic cascades in a complex terrestrial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9):5072-5076. doi:10.1073/pnas.96.9.5072
- Falleiros AMF, Bombonato MTS, Gregorio EA (2003) Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (2):287-294. doi:10.1590/s1516-89132003000200021
- Fellowes MDE, Godfray HCJ (2000) The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity* 84 (1):1-8. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00685.x
- Fox CW, Mousseau TA (1996) Larval host plant affects fitness consequences of egg size variation in the seed beetle *Stator limbatus*. *Oecologia* 107 (4):541-548. doi:10.1007/bf00333946
- Fox LR, Letourneau DK, Eisenbach J, Vannouhuys S (1990) Parasitism and sex-ratios of a parasitoid wasp - Effects of herbivore and plant-quality. *Oecologia* 83 (3):414-419
- Freitak D, Wheat CW, Heckel DG, Vogel H (2007) Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. *BMC Biol* 5. doi:10.1186/1741-7007-5-56

- Gentry GL, Dyer LA (2002) On the conditional, nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology* 83 (11):3108-3119. doi:10.1890/0012-9658(2002)083[3108:otcnon]2.0.co;2
- Godin J, Maltais P, Gaudet S (2002) Head capsule width as an instar indicator for larvae of the cranberry fruitworm (Lepidoptera: Pyralidae) in southeastern New Brunswick. *Journal of Economic Entomology* 95:1308-1313
- Gomez JM, Zamora R (1994) Top-down effects in a tritrophic system - Parasitoids enhance plant fitness. *Ecology* 75 (4):1023-1030. doi:10.2307/1939426
- Gotthard K (2004) Growth strategies and optimal body size in temperate *Parargini* butterflies. *Integrative and Comparative Biology* 44 (6):471-479. doi:10.1093/icb/44.6.471
- Greeney HF, Dyer LA, Smilanich AM (2012) Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical, physiological, morphological, and behavioral defenses against natural enemies. *Isj-Invertebrate Survival Journal* 9 (1):7-34
- Gross P (1993) Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology* 38:251-273. doi:10.1146/annurev.en.38.010193.001343
- Gwynn DM, Callaghan A, Gorham J, Walters KFA, Fellowes MDE (2005) Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272 (1574):1803-1808. doi:10.1098/rspb.2005.3089
- Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J (2008) Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Science* 322 (5905):1257-1259. doi:10.1126/science.1165265
- Hairton NG, Smith FE, Slobodkin LB (1960) Community structure, population control, and competition. *American Naturalist* 94 (879):421-425. doi:10.1086/282146
- Hawkins BA, Cornell HV, Hochberg ME (1997) Predators, parasitoids and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* 78:2145-2152
- Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 8 (1):8-13. doi:10.1016/s0952-7915(96)80098-7

- Hunter MD, Price PW (1992) Playing chutes and ladders - Heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communities. *Ecology* 73 (3):724-732
- Kalbe M, Kurtz J (2006) Local differences in immunocompetence reflect resistance of sticklebacks against the eye fluke *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasitology* 132:105-116. doi:10.1017/s0031182005008681
- Karimzadeh J, Bonsall MB, Wright DJ (2004) Bottom-up and top-down effects in a tritrophic system: the population dynamics of *Plutella xylostella* (L.)-*Cotesia plutellae* (Kurdjumov) on different host plants. *Ecological Entomology* 29 (3):285-293. doi:10.1111/j.0307-6946.2004.00609.x
- Karimzadeh J, Wright DJ (2008) Bottom-up cascading effects in a tritrophic system: interactions between plant quality and host-parasitoid immune responses. *Ecological Entomology* 33 (1):45-52. doi:10.1111/j.1365-2311.2007.00933.x
- Kaspi R, Mossinson S, Drezner T, Kamensky B, Yuval B (2002) Effects of larval diet on development rates and reproductive maturation of male and female Mediterranean fruit flies. *Physiological Entomology* 27 (1):29-38. doi:10.1046/j.1365-3032.2001.00264.x
- Klemola N, Kapari L, Klemola T (2008) Host plant quality and defence against parasitoids: no relationship between levels of parasitism and a geometrid defoliator immunoassay. *Oikos* 117 (6):926-934. doi:10.1111/j.2008.0030-1299.16611.x
- Klemola T, Klemola N, Andersson T, Ruohomaki K (2007) Does immune function influence population fluctuations and level of parasitism in the cyclic geometrid moth? *Population Ecology* 49 (2):165-178. doi:10.1007/s10144-007-0035-7
- Kortet R, Rantala MJ, Hedrick A (2007) Boldness in anti-predator behaviour and immune defence in field crickets. *Evolutionary Ecology Research* 9 (1):185-197
- Kraaijeveld AR, Ferrari J, Godfray HCJ (2002) Costs of resistance in insect-parasite and insect-parasitoid interactions. *Parasitology* 125:S71-S82. doi:10.1017/s0031182002001750
- Kraaijeveld AR, Vanalphen JJM (1995) Foraging behavior and encapsulation ability of *Drosophila melanogaster* larvae - correlated polymorphisms - (Diptera, Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior* 8 (3):305-314

- Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (10):1295-1309. doi:10.1016/s0965-1748(02)00092-9
- Leather SR (1994) Life history traits of insect herbivores in relation to host quality. In: Bernays EA (ed) *Insect-Plant Interactions*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 175-207
- Lee KP, Simpson SJ, Wilson K (2008) Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology* 22 (6):1052-1061. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01459.x
- Lill JT, Marquis RJ, Ricklefs RE (2002) Host plants influence parasitism of forest caterpillars. *Nature* 417 (6885):170-173. doi:10.1038/417170a
- Linder JE, Owers KA, Promislow DEL (2008) The effects of temperature on host-pathogen interactions in *D. melanogaster*: Who benefits? *Journal of Insect Physiology* 54 (1):297-308. doi:10.1016/j.jinsphys.2007.10.001
- Lindroth RL, Klein KA, Hemming JDC, Feuker AM (1997) Variation in temperature and dietary nitrogen affect performance of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L). *Physiological Entomology* 22 (1):55-64. doi:10.1111/j.1365-3032.1997.tb01140.x
- Lowenberger C (2001) Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31 (3):219-229. doi:10.1016/s0965-1748(00)00141-7
- Malnic E (2004) *Bien déguster et connaître le vin*. Solar ed.
- Marmaras VJ, Lampropoulou M (2009) Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* 21 (2):186-195. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.014
- Meyhofer R, Casas J (1999) Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *Journal of Insect Physiology* 45 (11):967-971. doi:10.1016/s0022-1910(99)00060-8
- Mikolajewski DJ, Johansson F (2004) Morphological and behavioral defenses in dragonfly larvae: trait compensation and cospecialization. *Behavioral Ecology* 15 (4):614-620. doi:10.1093/beheco/arh061
- Miller TEX (2008) Bottom-up, top-down, and within-trophic level pressures on a cactus-feeding insect. *Ecological Entomology* 33 (2):261-268. doi:10.1111/j.1365-2311.2007.00964.x

- Moreau J, Arruego X, Benrey B, Thiery D (2006a) Differences in nutritional quality of parts of *Vitis vinifera* berries affect fitness of the European grapevine moth. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 119 (93-99)
- Moreau J, Benrey B, Thiery D (2006b) Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? *Functional Ecology* 20 (4):592-600. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01145.x
- Moreau J, Benrey B, Thiery D (2006c) Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* 96:205-212
- Moreau J, Richard A, Benrey B, Thiéry D (2009) Host plant cultivar of the grapevine moth *Lobesia botrana* affects the life history traits of an egg parasitoid. *Biological Control* 50:117-122
- Moreau J, Thiéry D, Troussard JP, Benrey B (2007) Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology* 32:747-753
- Moreau J, Villemant C, Benrey B, Thiery D (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): The influence of region and cultivar. *Biological Control* 54 (3):300-306. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.05.019
- Moret Y, Schmid-Hempel P (2000) Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290 (5494):1166-1168. doi:10.1126/science.290.5494.1166
- Moret Y, Schmid-Hempel P (2009) Immune responses of bumblebee workers as a function of individual and colony age: senescence versus plastic adjustment of the immune function. *Oikos* 118 (3):371-378. doi:10.1111/j.1600-0706.2008.17187.x
- Nappi AJ, Ottaviani E (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 22 (5):469-480. doi:10.1002/(sici)1521-1878(200005)22:5<469::aid-bies9>3.0.co;2-4

- Nappi AJ, Vass E (1993) Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. *Pigment Cell Research* 6 (3):117-126. doi:10.1111/j.1600-0749.1993.tb00590.x
- Nappi AJ, Vass E (1998) Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *Journal of Parasitology* 84 (6):1150-1157. doi:10.2307/3284664
- Ode PJ (2006) Plant chemistry and natural enemy fitness: Effects on herbivore and natural enemy interactions. In: *Annual Review of Entomology*, vol 51. Annual Review of Entomology. Annual Reviews, Palo Alto, pp 163-185. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151110
- Ojala K, Julkunen-Tiito R, Lindstrom L, Mappes J (2005) Diet affects the immune defence and life-history traits of an Arctiid moth *Parasemia plantaginis*. *Evolutionary Ecology Research* 7 (8):1153-1170
- Otti O, Gantenbein-Ritter I, Jacot A, Brinkhof MWG (2012) Immune response increases predation risk. *Evolution* 66 (3):732-739. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01506.x
- Panzavolta T (2007) Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. *Environmental Entomology* 36:1054-1058
- Parker BJ, Barribeau SM, Laughton AM, de Roode JC, Gerardo NM (2011) Non-immunological defense in an evolutionary framework. *Trends in Ecology & Evolution* 26 (5):242-248. doi:10.1016/j.tree.2011.02.005
- Pearson CV, Dyer LA (2006) Trophic diversity in two grassland ecosystems. *Journal of Insect Science* 6
- Ponton F, Wilson K, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ (2011) Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *PLoS Pathog* 7 (12). doi:10.1371/journal.ppat.1002223
- Ponton F, Wilson K, Holmes AJ, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ (2013) Integrating nutrition and immunology: A new frontier. *Journal of Insect Physiology* 59 (2):130-137. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.10.011
- Poppy GM (1997) Tritrophic interactions: Improving ecological understanding and biological control? *Endeavour* 21 (2):61-65. doi:10.1016/s0160-9327(97)01042-9

- Povey S, Cotter SC, Simpson SJ, Lee KP, Wilson K (2009) Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? *Journal of Animal Ecology* 78 (2):437-446. doi:10.1111/j.1365-2656.2008.01499.x
- Power ME (1992) Top-down and bottom-up forces in food webs - Do plants have primacy ? *Ecology* 73 (3):733-746. doi:10.2307/1940153
- Price PW, Bouton CE, Gross P, McPherson BA, Thompson JN, E. WA (1980) Interactions among three trophic levels : Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 11:41-65
- Price PW, Hunter MD (2005) Long-term population dynamics of a sawfly show strong bottom-up effects. *Journal of Animal Ecology* 74 (5):917-925. doi:10.1111/j.1365-2656.2005.00989.x
- Ratcliffe NA, Gagen SJ (1976) Cellular defense reactions of insect hemocytes in vivo: Nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J Invertebr Pathol* 28(3): 373-382
- Ratcliffe NA, Rowley AF (1979) Role of insect hemocytes against biological agents. In: *Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques*. A.P. Gupta, Ed., Cambridge University Press, pp. 31-414
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2005) Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (3):316-327. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x
- Reznick D, Nunney L, Tessier A (2000) Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends in Ecology & Evolution* 15 (10):421-425. doi:10.1016/s0169-5347(00)01941-8
- Rigby MC, Jokela J (2000) Predator avoidance and immune defence: costs and trade-offs in snails. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 267 (1439):171-176. doi:10.1098/rspb.2000.0983
- Rolff J, Armitage SAO, Coltman DW (2005) Genetic constraints and sexual dimorphism in immune defense. *Evolution* 59 (8):1844-1850

- Sabelis MW, van Baalen M, Pels B, Egas M, Janssen A (2002) Evolution of Exploitation and Defense in Tritrophic Interactions.
- Schmid-Hempel P (2003) Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270 (1513):357-366. doi:10.1098/rspb.2002.2265
- Sentenac G (2011) La faune auxiliaire de la vigne. France Agricole Eds
- Sharon R, Zahavi T, Soroker V, Harari AR (2009) The effect of grape vine cultivars on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) population levels. *Journal of Pest Science* 82:187-193
- Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11 (8):317-321. doi:10.1016/0169-5347(96)10039-2
- Shikano I, Ericsson JD, Cory JS, Myers JH (2010) Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. *Basic and Applied Ecology* 11 (1):15-22. doi:10.1016/j.baae.2009.06.008
- Singer MS, Carriere Y, Theuring C, Hartmann T (2004) Disentangling food quality from resistance against parasitoids: Diet choice by a generalist caterpillar. *American Naturalist* 164 (3):423-429. doi:10.1086/423152
- Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J (2005) Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. In: Simpson SJ (ed) *Advances in Insect Physiology*, Vol 32, vol 32. *Advances in Insect Physiology*. pp 1-48. doi:10.1016/s0065-2806(05)32001-7
- Siva-Jothy MT, Thompson JJW (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology* 27 (3):206-212. doi:10.1046/j.1365-3032.2002.00286.x
- Smilanich AM, Dyer LA, Chambers JQ, Bowers MD (2009) Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecology Letters* 12 (7):612-621. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01309.x
- Smilanich AM, Mason PA, Sprung L, Chase TR, Singer MS (2011a) Complex effects of parasitoids on pharmacophagy and diet choice of a polyphagous caterpillar. *Oecologia* 165 (4):995-1005. doi:10.1007/s00442-010-1803-1

- Smilanich AM, Vargas J, Dyer LA, Bowers MD (2011b) Effects of Ingested Secondary Metabolites on the Immune Response of a Polyphagous Caterpillar *Grammia incorrupta*. *Journal of Chemical Ecology* 37 (3):239-245. doi:10.1007/s10886-011-9924-5
- Srygley RB, Lorch PD, Simpson SJ, Sword GA (2009) Immediate protein dietary effects on movement and the generalised immunocompetence of migrating Mormon crickets *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Ecological Entomology* 34 (5):663-668. doi:10.1111/j.1365-2311.2009.01117.x
- Steiner UK, Pfeiffer T (2007) Optimizing time and resource allocation trade-offs for investment into morphological and behavioral defense. *American Naturalist* 169 (1):118-129. doi:10.1086/509939
- Strand MR (2008) The insect cellular immune response. *Insect Science* 15 (1):1-14. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x
- Sugumaran M, Nellaiappan K, Valivittan K (2000) A new mechanism for the control of phenoloxidase activity: Inhibition and complex formation with quinone isomerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379 (2):252-260. doi:10.1006/abbi.2000.1884
- Tammaru T, Esperk T, Castellanos I (2002) No evidence for costs of being large in females of *Orgyia spp.* (Lepidoptera, Lymantriidae): larger is always better. *Oecologia* 133 (3):430-438. doi:10.1007/s00442-002-1057-7
- Teder T, Tammaru T (2002) Cascading effects of variation in plant vigour on the relative performance of insect herbivores and their parasitoids. *Ecological Entomology* 27 (1):94-104. doi:10.1046/j.0307-6946.2001.00381.x
- Thiéry D (2005) Vers de la grappe : les connaître pour s'en protéger. Bordeaux : Vigne & Vin Publications Internationales.
- Thiéry D (2008) Les ravageurs de la Vigne. 2nd edn. Féret Bordeaux
- Thiery D, Moreau J (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia* 143 (4):548-557. doi:10.1007/s00442-005-0022-7
- Thiéry D, Moreau J (2013) Induction natale de la préférence pour l'habitat (NHPI). In: IRD (ed) Interactions Insectes-Plantes.

- Tinsley MC, Blanford S, Jiggins FM (2006) Genetic variation in *Drosophila melanogaster* pathogen susceptibility. *Parasitology* 132:767-773. doi:10.1017/s0031182006009929
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, McMinn M, Rodríguez-Molina A (2005) Larval food source promotes cyclic seasonal variation in polyandry in the moth *Lobesia botrana*. *Behavioral Ecology* 16:114-122
- Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, Roehrich R, Stockel J (1999) Vine phenological stage during larval feeding affects male and female reproductive output of *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* 89 (6):549-556
- Torres-Vila LM, Stockel J, Rodríguez-Molina MC (1997) Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Physiological Entomology* 22 (4):387-393. doi:10.1111/j.1365-3032.1997.tb01184.x
- Tsakas S, Marmaras VJ (2010) Insect immunity and its signalling: an overview. *Isj-Invertebrate Survival Journal* 7 (2):228-238
- Tscharntke T, Hawkins BA (2002) *Multitrophic Level Interactions*. Cambridge University Press,
- Turlings TCJ, Wackers F (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Advances in Insect Chemical Ecology*:21-75. doi:10.1017/cbo9780511542664.003
- Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, Hoffmann JA, Imler JL (2000) Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13 (5):737-748. doi:10.1016/s1074-7613(00)00072-8
- Van Buskirk J, McCollum SA (2000) Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology* 203 (14):2149-2158
- van Lenteren JC, Bale J, Bigler E, Hokkanen HMT, Loomans AM (2006) Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology* 52:609-634
- Vinson SB (1998) The general host selection behavior of parasitoid hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control* 11 (2):79-96. doi:10.1006/bcon.1997.0601

- Visser M (2011) An evaluation of the efficacy of antimicrobial peptides against grapevine pathogens. University of Stellenbosch,
- Vogelweith F, Moret Y, Thiery D, Moreau J (2013a) *Lobesia botrana* Larvae Develop Faster in the Presence of Parasitoids. Plos One 8 (8). doi:10.1371/journal.pone.0072568
- Vogelweith F, Thiery D, Moret Y, Moreau J (2013b) Immunocompetence increases with larval body size in a phytophagous moth. Physiological Entomology 38 (3):219-225. doi:10.1111/phen.12025
- Vogelweith F, Thiery D, Quaglietti B, Moret Y, Moreau J (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. Functional Ecology 25 (6):1241-1247. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01911.x
- Walker M, Hartley SE, Jones TH (2008) The relative importance of resources and natural enemies in determining herbivore abundance: thistles, tephritids and parasitoids. Journal of Animal Ecology 77 (5):1063-1071. doi:10.1111/j.1365-2656.2008.01406.x
- Walker M, Jones TH (2001) Relative roles of top-down and bottom-up forces in terrestrial tritrophic plant-insect herbivore-natural enemy systems. Oikos 93 (2):177-187. doi:10.1034/j.1600-0706.2001.930201.x
- Williams IS (1999) Slow-growth, high-mortality - a general hypothesis, or is it? Ecological Entomology 24 (4):490-495. doi:10.1046/j.1365-2311.1999.00217.x
- Zhu L, Zhang YL, Deng JJ, Li HR, Lu J (2012) Phenolic Concentrations and Antioxidant Properties of Wines Made from North American Grapes Grown in China. Molecules 17 (3):3304-3323. doi:10.3390/molecules17033304



---

## ANNEXES

---

## ANNEXE 1

# IMMUNOCOMPETENCE INCREASES WITH LARVAL BODY SIZE IN A PHYTOPHAGOUS MOTH

VOGELWEITH, F.<sup>1</sup>, THIERY, D.<sup>2</sup>, MORET, Y.<sup>1</sup> & MOREAU, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup>INRA UMR 1065 Save, Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France

**Key-words:** *Eupoecilia ambiguella*, haemocyte count, immune-challenged larvae, larval body size, larval immune defence, phenoloxidase enzyme cascade



*Physiological Entomology* (2013) **38**, 219–225

DOI: 10.1111/phen.12025

## Immunocompetence increases with larval body size in a phytophagous moth

FANNY VOGELWEITH<sup>1</sup>, DENIS THIERY<sup>2,3</sup>, YANNICK MORET<sup>1</sup> and  
JÉRÔME MOREAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe Ecologie-Evolutive, Université de Bourgogne, Dijon, France, <sup>2</sup>UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRA, Villenave d'Ornon, Cedex, France and <sup>3</sup>UMR Save INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux, Villenave d'Ornon, Cedex, France

### 1. INTRODUCTION

Fungal pathogens, bacteria, nematodes and parasitoids are the greatest biotic causes of mortality in insects (Hawkins et al., 1997). However, the success of insects at avoiding and surviving infections may be attributable to their immune system (Zuk & Stoehr, 2002). To combat infection, insects rely on immune effector systems including haemocytes and enzymes of the PO cascade that are the frontline of physiological defences against a large range of pathogenic insults. They provide rapid clearance of more than 99% of the entering bacterial pathogens in the haemocoel (Haine et al., 2008) and could even deal with large pathogens like nematodes and parasitoid eggs by forming melanotic capsules around them (Blumberg, 1997; Kraaijeveld et al., 2001; Smilanich et al., 2009; see also Blumberg & Luck, 1990; Strand &

Pech, 1995 for review). Melanotic capsules result from haemocytes smothering the invader and the activity of the PO enzyme melanising the resultant cell mass (Cerenius & Söderhäll, 2004; Siva-Jothy et al., 2005). This active enzyme is produced from its inactive precursor, prophenoloxidase (PPO), which is stored in the haemolymph and haemocytes. Its activation is often accompanied by the release of reactive oxygen species having a cytotoxic oxidative effect on pathogens (Carton et al., 2008). All these processes generally lead to the death of the pathogen.

Despite the obvious benefit of having an efficient immune system, large individual differences exist in immune ability (Sadd & Schmid-Hempel, 2009). Such variation is often negatively linked to other life history traits (Gwynn et al., 2005), influencing individual fitness, and potentially affecting population dynamics (Blumberg, 1997; Schmid-Hempel, 2005; González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Therefore, understanding the immune response set-up and the causes of variation in immunocompetence is becoming a central theme in ecology (Rolff & Siva-Jothy, 2003; Schmid-Hempel, 2005; Schulenburg et al., 2009). Many biotic and abiotic variables affecting insect immune response have been identified. For instance, temperature (Lynn & Vinson, 1977; Blumberg, 1997; Linder et al., 2008), host plant quality for phytophagous insects (Klemola et al., 2007; Smilanich et al., 2009; Vogelweith et al., 2011), sex (Zuk & Stoehr, 2002), and physiological conditions (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012 and references therein) affect immune responses in many groups of insects. Immune response may vary during the life of an individual at different developmental stages, and also with age (Blumberg, 1997; Ryder & Siva-Jothy, 2001; Grove & Hoover, 2007; Eleftherianos et al., 2008; McNeill et al., 2010). Furthermore, accumulated resources may also be of importance in determining the potential strength of an immune response developed by an individual upon challenge. Indeed, as maintenance and use of the immune system impose resource-based trade-offs (Rolff & Siva-Jothy, 2003), high resources (e.g. lipid stock) may provide more energy to mount a better immune response against pathogens (Cheon et al., 2006). Insect larval body size accurately reflects body condition in terms of protein, lipid and carbohydrate contents (Timmermann & Briegel, 1999; Glazier, 2005). While larvae vary in body size along developmental stages, they also could vary in size within the same developmental stage or age, probably because of variable ability to compete for resources.

Thus, for a given age, large larvae are expected to have accumulated more resources (e.g. by eating more) and should therefore be able to allocate more resources to immune

defences than smaller larvae. Unfortunately, in many studies on the immune ability of insect larvae, larval body size is often not measured in experiments (for exceptions: Lee et al., 2008; Bukovinszky et al., 2009; Shikano et al., 2010; Vogelweith et al., 2011). Examining the effect of larval body size on immunocompetence could improve our general understanding of the key factors that drive variation of immunocompetence in natural populations. Furthermore, it would also be useful to determine the extent to which body size should be taken into account for the design of experiments and statistical analysis in ecological immunity studies.

To test the effect of larval body size on immunocompetence, we therefore studied European Grape Berry Moth larvae (*Eupoecilia ambiguella*) (Lepidoptera, Tortricidae), at the same larval-stage and age. As with many other highly immobile fruit-inhabiting larvae, immune defence probably represents an important selective advantage against parasitoid attacks for *E. ambiguella* as opposed to escape behaviour. Here, we investigated the effect of larval body size on the haemocyte count, and on the maintenance and use of the PO enzyme cascade, in the haemolymph of immunologically naïve larvae of *E. ambiguella*. Furthermore, we measured the strength of their immune response to bacterial infection and examined the potential relationship between immune response and larval body size.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Insects**

Insects used in this study were from an inbred stock of the European Grape Berry Moth, *E. ambiguella* reared at the INRA of Bordeaux (Aquitaine, France) for several years. This culture is based on a great number of adults caged (several thousand per week) in which wild adults are periodically added. This lab strain has conserved genetic variability, since we found considerable variation in immune parameters between larvae (Vogelweith et al. 2011). In addition, in preliminary experiments, we found a very similar pattern in terms of basal immunity level and parasitoid escape behaviour between inbred stock and wild lines sampled in French vineyards (Vogelweith et al. *unpublished* results). Therefore, the results obtained with this lab strain could be extrapolated to field populations. Larvae were maintained in boxes (18 x 11.5 x 7cm) on a semi-artificial diet, as described in Thiéry & Moreau (2005), except for hygrometry ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  r.h., photoperiod L16:D8), with a density of 100 individuals per 300 ml of diet.

## 2.2. Experimental protocol: general procedure

Larvae of the same larval-instar (L5 instar) and age (27 days post-hatching) were collected from the stock culture. After being chilled for 10 minutes on ice, a one  $\mu\text{l}$  sample of haemolymph was collected and flushed into a micro-centrifuge tube containing 20  $\mu\text{l}$  of sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer (0.01M sodium cacodylate; 0.005M  $\text{CaCl}_2$ ; pH 6.5) to measure levels of immune defence in naïve larvae. Larvae were then immediately wounded in the posterior part of the ventral side of the abdomen with a sterile needle that had been dipped either into sterile Ringer solution or into a concentrated suspension of heat-killed *Arthrobacter globiformis* (about  $10^9$  cells. $\text{ml}^{-1}$ ). Larvae were kept individually in micro-centrifuge tubes containing diet, under standard conditions, for 24 hours. A second sample of haemolymph was collected as described above to measure levels of immune defence after wounding (control and challenged). The samples of haemolymph for the haemocyte count were measured immediately. The haemolymph samples used to measure the levels of maintenance and use of the PO enzyme cascade were immediately stored at  $-27^\circ\text{C}$ , to await assay. Larval body size was estimated by measuring the distance between the most distant lateral sides of the head capsule margins (Delbac *et al.*, 2010), using a Nikon SMZ-10A stereoscopic microscope and VTO 232 video analysis system (Linkam Scientific Instruments). This indicator of larval body size is commonly used in Lepidoptera and allows differentiation between larval instars in *L. botrana* (Godin *et al.*, 2002; Panzavolta, 2007; Delbac *et al.*, 2010). In our study model, body length and weight measurements were not used, as sizing and weighing living larvae is extremely difficult, especially in the case of old larvae, which move vigorously and are thus tricky to handle. Indeed, the head capsule measurement of dead larvae is the most reliable measurement of size in *L. botrana*.

Due in large part to (i) the small size of the larvae and (Ojala *et al.*) the fact that two haemolymph samples were collected within 24 hours, we were not able to collect enough haemolymph to measure both haemocyte count and PO enzyme cascade activity in the same individual. Consequently, we performed two distinct experiments to assess these two key immune parameters. We used 30 larvae to measure the haemocyte count (16 larvae injected with a suspension of *A. globiformis* and 14 larvae control) and 21 larvae to measure the PO enzyme activity (10 larvae injected with a suspension of *A. globiformis* and 11 larvae control).

### 2.3. Immune parameters

The haemocyte count was measured using a Neubauer improved haemocytometer under a microscope (magnification x 400). The activity of naturally activated PO enzymes alone (hereafter PO activity) and the activity of the proenzymes (PPO) combined with that of the PO (hereafter total-PO activity) were both measured using a spectrophotometer following the method described in Cornet *et al.* (2009). The PO activity was quantified without further activation, while total-PO activity required activation of the PPO with chymotrypsin to produce active PO. For this purpose, frozen haemolymph samples were thawed on ice and centrifuged (6500 r.p.m., 15 min, 4°C). Five µl of supernatant was added to a microplate well, containing 20 µl of PBS, and either 140 µl of distilled water to measure PO activity alone, or 140 µl of chymotrypsin solution (Sigma C-7762, 0.07 mg/ml of distilled water) to measure total-PO activity. Then 20 µl of L-Dopa solution (Sigma D-9628, 4 mg/ml of distilled water) was added to each well. The reaction was allowed to proceed at 30°C in a microplate reader (Versamax, Molecular Devices) for 40 minutes. Readings were taken every 15 seconds at 490 nm and analysed using SOFT-Max®Pro 4.0 software (Molecular Devices). Enzyme activity was measured as the slope (Vmax value: change in absorbance unit/min) of the reaction curve during the linear phase of the reaction and recalculated as the activity of 1 µl of pure haemolymph.

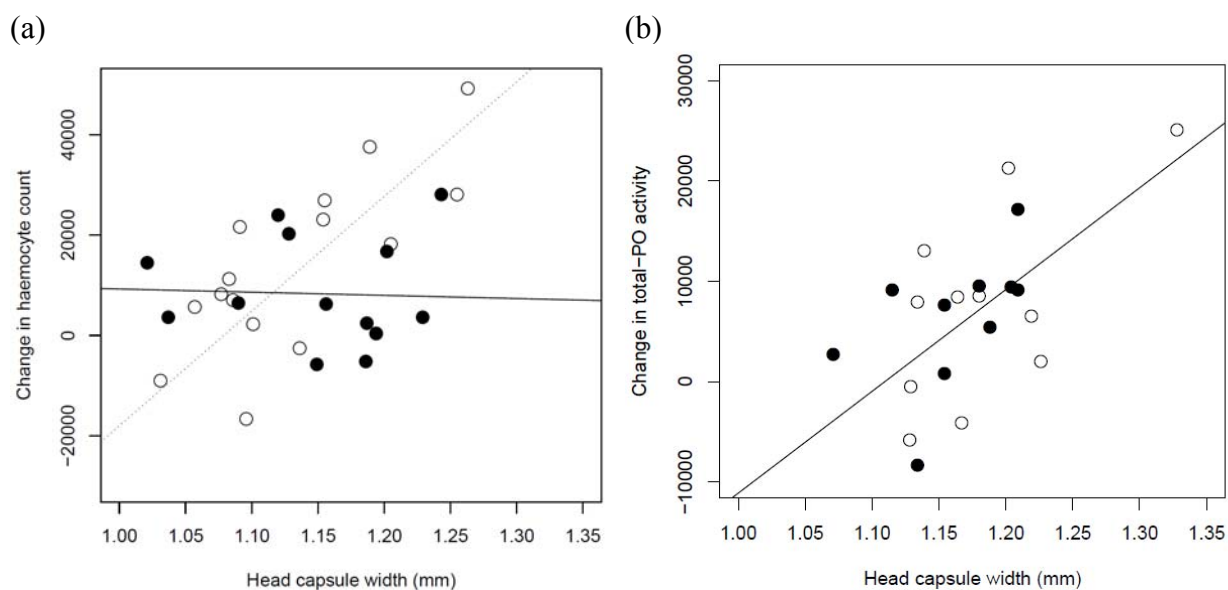
### 2.4. Statistics

Relationships between immune parameters and body size of naïve larvae were examined using Pearson's correlation tests with a confidence interval of 95% (C.I.) on natural-log transformations. When the C.I. included 0, the correlation was not significant. Changes in the haemocyte count and in PO and total-PO activity after a bacterial immune challenge were analysed using analyses of variance for repeated measures (repeated ANOVA) with the immune challenge as factor and larval body size as covariate. The assumption for parametric tests was ensured by the natural-log transformations of immune parameters. We confirmed the results of the repeated ANOVA by using Pearson's correlation tests between change of immune effectors and larval body size with a C.I. of 95%. All the data were analysed using the R software (version 2.11.1).

### 3. RESULTS

In immunologically naïve larvae (i.e. before wounding), haemocyte count was negatively correlated with larval body size (Pearson's correlation coefficients:  $r = -0.43$ ,  $p = 0.018$ , C.I. =  $[-0.68; -0.08]$ ). Larger larvae had fewer haemocytes than smaller ones. No correlation was found for larval body size with either PO or total-PO activity (Pearson's correlation coefficients: for PO activity,  $r = -0.02$ ,  $p = 0.94$ , C.I. =  $[-0.42; 0.44]$ ; for total-PO activity,  $r = -0.30$ ,  $p = 0.19$ ; C.I. =  $[-0.64; 0.17]$ ).

Wounding larvae with either a clean glass needle or a needle bearing heat-killed bacteria caused an increase both in haemocyte count and in total-PO activity, 24 hours after the first collection of haemolymph. However, PO activity showed no change (Pearson's correlation coefficients: (a) control larvae,  $r = 0.33$ ;  $p = 0.25$ ; C.I. =  $[-0.21; 0.75]$  (b) challenged larvae  $r = 0.09$ ;  $p = 0.85$ ; C.I. =  $[-0.67; 0.82]$  (Table 1). Enhanced haemocyte count and total-PO activity after wounding was dependent on larval body size (Table 1). These immune parameters increased more in larger larvae than in smaller ones (Fig. 1a and b). However, this size-dependent immune response to wounding was also dependent on whether the needle was clean or contaminated with bacteria (Table 1). The increased haemocyte count in the haemolymph was positively related to body size only among the larvae that had been immune-challenged with heat-killed bacteria (Fig. 1a) (as indicated by the significant interaction Time\*Larval body size\*Treatment; Table 1).



**Fig. 1:** (a) Change in haemocyte count after an immune challenge (difference between measurement after and before challenge) in relation to larval body size, *E. ambiguella*. While haemocyte count covaries positively with body size of bacterially treated larvae (open circles, dashed line: Pearson's correlation coefficients:  $r = 0.68$ ;  $p = 0.003$ ; C.I. = [0.28; 0.88]), no relation with body size was found in control larvae (full circle and solid line, Pearson's correlation coefficients,  $r = 0.04$ ;  $p = 0.88$ ; C.I. = [-0.50; 0.56]). (b) Change in total-PO activity after an immune challenge (difference between measurement after and before challenge) in relation to larval body size, *E. ambiguella*, in both control (full circles) and bacterially treated (open circles) groups (Pearson's correlation coefficients on pooled data,  $r = 0.61$ ;  $p = 0.005$ ; C.I. = [0.25; 0.83]).

**Table 1:** Results of the analysis for repeated measurements of haemocyte count (Haemocyte), PO activity and total-PO activity. Values  $p \leq 0.05$  are given in bold.

|                                  | Haemocyte   |              | PO activity |      | Total-PO activity |             |
|----------------------------------|-------------|--------------|-------------|------|-------------------|-------------|
| Source                           | $F_{1,26}$  | $p$          | $F_{1,17}$  | $P$  | $F_{1,17}$        | $P$         |
| Between subjects                 |             |              |             |      |                   |             |
| Larval body size                 | 0.02        | 0.89         | 0.87        | 0.36 | 1.04              | 0.32        |
| Treatment                        | <b>5.37</b> | <b>0.03</b>  | 1.75        | 0.20 | 0.91              | 0.35        |
| Larval body size* Treatment      | 0.11        | 0.75         | 0.05        | 0.82 | 0.09              | 0.77        |
| Within subjects                  |             |              |             |      |                   |             |
| Time                             | <b>6.98</b> | <b>0.01</b>  | 0.38        | 0.54 | <b>6.12</b>       | <b>0.02</b> |
| Time*Larval body size            | <b>8.58</b> | <b>0.007</b> | 0.53        | 0.48 | <b>6.82</b>       | <b>0.02</b> |
| Time*Treatment                   | 1.28        | 0.27         | 0.56        | 0.47 | 0.10              | 0.75        |
| Time*Larval body size* Treatment | <b>7.54</b> | <b>0.01</b>  | 0.06        | 0.80 | 0.04              | 0.84        |

## 4. DISCUSSION

Haemocytes and the PO enzyme cascade (PPO and PO activity) are the frontline of immune defence against parasites entering the insect haemocoel (Lavine & Strand, 2002; Cerenius & Söderhäll, 2004; Haine et al., 2008; Strand, 2008). In this context, we measured three parameters in relation to larval body size for *E. ambiguella* of the same age in order to determine the effect of larval body size on immunocompetence. Our results show that (1) basal levels of PO and total-PO activity in larvae are independent of larval body size, while basal levels of haemocyte load decreased with larval body size; and (2) although there is no change in PO activity when the larval immune system is challenged (here, with a single injection of bacteria), the amplitude of the immune response involving haemocytes and total-PO activity is significantly stronger in large immune-challenged larvae than in smaller larvae of the same age. These results suggest that higher immunocompetence in larger larvae relies on mobilising haemocyte production and enzymes of the PPO system in reaction to an immune challenge, rather than constantly maintaining high basal levels of immune defences. This may indicate that maintaining high baselines of immune effectors when naïve could be more costly than rapidly inducing the production of these immune effectors when exposed to an infection.

Haemocytes are certainly the most important functional elements involved in the recognition and encapsulation of pathogens (Lavine & Strand, 2002). In *E. ambiguella*, after an immune challenge, there was a clear increase in the recruitment rate of haemocytes in the haemolymph, probably released from the hematopoietic organ and/or by continued division of circulating haemocytes (Ratcliffe et al., 1985; Lavine & Strand, 2002). Such haemocyte recruitment is very rapid (within 24 hours) and greater in larger larvae, despite the fact that larger larvae harbour fewer haemocytes when naïve. We found no change in PO activity 24 hours after the immune challenge. This result is not surprising since previous studies have shown that PO activity seems to be highly plastic in comparison to PPO (Cornet et al., 2009). In addition, PPO probably reflects the strength of the immune system better than PO (Cornet et al., 2009). We found a positive relationship between larval body size and total-PO activity in response to an immune challenge (injection of bacteria), but we found the same relationship for the control (injected with Ringer). This lack of difference in response could be explained by the effect of the mechanical puncture performed during the first haemolymph sampling for the two groups. In both groups, these puncture wounds in the cuticle had to be

rapidly healed by a melanotic plug and coagulation of the haemolymph. Several studies have shown that a mechanical injury induces a deposition of melanin around the damaged tissue (Cerenius & Söderhäll, 2004; Nappi & Christensen, 2005). Previous studies and recent findings confirm that melanin is synthesised from the PO enzyme cascade (Lai et al., 2002) and is associated with factors stimulating the coagulation response in insects (Eleftherianos & Revenis, 2011 and references therein). The mobilisation of the PO enzyme cascade for wound healing and coagulation was probably such that the additional stimulation by the bacterial challenge produced no further effect.

The greater immune response to a challenge may indicate that larger larvae can invest more in their immune system because the energy required to mount an immune response is more readily available in larger larvae. Many studies indicate that PO is a costly trait, implying that setup and maintenance of the PPO activating system is condition-dependent (Barnes & Siva-Jothy, 2000). Several studies have indicated that individuals in better condition produce higher levels of PPO and/or PO (see González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012 for a review) and that the strength of the immune response is down-regulated by nutritional stress or starvation (Siva-Jothy & Thompson, 2002; Rantala et al., 2003a, 2003b; Yang et al., 2007). In a sibling species, larval body size reflects body condition since it does predict adult fitness (Thiéry & Moreau, 2005; Moreau et al., 2006a, 2006b). Therefore, a positive relationship is expected between size and the ability to mount a costly immune response. Our results are consistent with this prediction, indicating that the strength of immune responses is condition-dependent. Furthermore, our results may provide an explanation for a previous finding, where higher body weights were correlated with higher encapsulation levels in *Pieris rapae* larvae (Bukovinszky et al., 2009).

The ability of insects to mobilise enzymes of the PO cascade and haemocytes upon an immune challenge was shown to be related to their ability to encapsulate parasitoid eggs, as previously shown in *Drosophila* (Eslin & Prevost, 1996, 1998; Jiang et al., 2010). Therefore, we may hypothesise that larger individuals present an increased ability to withstand attacks by pathogens during their larval lifetime. Our findings may have important implications for the evolution of plant herbivore parasitoid interactions (i.e. tritrophic relationships). Several studies have shown the influence of host plants on parasitism rates in the field (Fuentes-Contreras et al., 1996; Helms et al., 2004; Thompson et al., 2005; Ode, 2006 for a review and references therein). Among different factors that could explain this variable susceptibility, the ability of the phytophagous insect to mount an effective immune response against natural

enemies has recently been proposed (Ojala et al., 2005; Kapari et al., 2006; Klemola et al., 2007; Karimzadeh & Wright, 2008; Vogelweith et al., 2011). Here, our results suggest that larval body size, possibly mediated by food consumption, could be a potential factor in explaining why some larvae are more vulnerable to parasitoids on a given host plant. In line with this, in the sibling species (*L. botrana*), we found that two species of parasitoids emerged from smaller pupae (Moreau et al., 2010). Our findings may therefore explain these observations *in natura* and we anticipate that size-dependent immunocompetence could have serious consequences in natural populations. For example, it could affect the expected efficacy of released parasitoids in a biological control context and could explain failures of parasitoid establishment related to the size of target larvae.

Finally, our findings emphasise that larval body size is an important, but underestimated, factor that could shape the immunocompetence of an individual, suggesting that smaller larvae might be more vulnerable to infection. Unfortunately, in many studies assessing the immune ability of larvae, larval body size is not controlled, producing some noise in the results, especially when comparing different species or different experimental groups. Therefore, in light of our results, we recommend that larval body size should be taken into account in ecological immunity studies, or at least considered as a covariate when measuring insect immune systems. Clearly, some additional experiments in another biological system should address this issue, in order to define the importance of body size in immune ability.

## Acknowledgements

We thank G. Wegner-Kiss for providing the initial moth strain, L. Delbac for technical assistance producing larvae and C. Chateau-Smith for English proof-reading. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Regional Councils of Bourgogne and of Aquitaine.

## References

- Barnes, A.I. & Siva-Jothy, M.T. (2000) Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **267**, 177–182.

- Blumberg, D. & Luck, R.F. (1990) Differences in the rates of superparasitism between two strains of *Comperiella bifasciata* (Howard) (Hymenoptera : Encyrtidae) parasitizing California red scale (Homoptera : Diuridae): An adaptation to circumvent encapsulation? *Annual Entomology Society of America*, **83**, 591-597.
- Blumberg, D. (1997) Parasitoid Encapsulation as a Defense Mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and Its Importance in Biological Control. *Biological Control*, **8**, 225-236.
- Bukovinszky, T., Poelman, E., Gols, R. *et al.* (2009) Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immune defence of a herbivore against parasitism. *Oecologia*, **160**, 299-308.
- Carton, Y., Poirié, M. & Nappi, A.J. (2008) Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science*, **15**, 67-87.
- Cheon, H.M., Shin, S.W., Bian, G. *et al.* (2006) Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 8426-35.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **199**, 116-126.
- Cornet, S., Biard, C. & Moret, Y. (2009) Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia*, **159**, 257-269.
- Delbac, L., Lecharpentier, P. & Thiéry, D. (2010) Larval instars determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Protection*, **29**, 623-630.
- Eleftherianos, I., Baldwin, H., ffrench-Constant, R.H. *et al.* (2008) Developmental modulation of immunity: changes within the feeding period of the fifth larval stage in the defence reactions of *Manduca sexta* to infection by *Photorhabdus*. *Journal of Insect Physiology*, **54**, 309-18.
- Eleftherianos, I. & Revenis, C. (2011) Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of Innate Immunity*, **3**, 28-33.
- Eslin, P., Giordanengo, P., Fourdrain, Y. *et al.* (1996) Avoidance of encapsulation in the absence of VLP by a braconid parasitoid of *Drosophila* larvae: an ultrastructural study. *Canadian Journal of Zoology*, **74**, 2193-2198.
- Eslin, P. & Prevost, G. (1998) Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 807-816.

- Fuentes-Contreras, J.E., Powell, W., Wadhams, L.J. *et al.* (1996) Influence of wheat and oat cultivars on the development of the cereal aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* and the generalist aphid parasitoid *Ephedrus plagiator*. *Annals of Applied Biology*, **128**, 181-187.
- Glazier, D.S. (2005) Beyond the “3/4-power law”: variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. *Biological Reviews*, **80**, 611-662.
- Godin, J., Maltais, P. & Gaudet, S. (2002) Head capsule width as an instar indicator for larvae of the cranberry fruitworm (Lepidoptera: Pyralidae) in southeastern New Brunswick. *Journal of Economic Entomology*, **95**, 1308-1313.
- González-Santoyo, I. & Córdoba-Aguilar, A. (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **142**, 1-16.
- Grove, M.J. & Hoover, K. (2007) Intrastadial developmental resistance of third instar gypsy moths (*Lymantria dispar* L.) to *L. dispar* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, **40**, 355-361.
- Gwynn, D.M., Callaghan, A., Gorham, J. *et al.* (2005) Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 1803-8.
- Haine, E.R., Moret, Y., Siva-Jothy, M.T. *et al.* (2008) Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Sciences*, **322**, 1257-1259.
- Hawkins, B.A., Cornell, H.V. & Hochberg, M.E. (1997) Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, **78**, 2145-2152.
- Helms, S.E., Connelly, S.J. & Hunter, M.D. (2004) Effects of variation among plant species on the interaction between a herbivore and its parasitoid. *Ecological Entomology*, **29**, 44-51.
- Jiang, H., Vilcinskas, A. & Kanost, M.R. (2010) Immunity in lepidopteran insects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **708**, 181-204.
- Kapari, L., Haukioja, E., Rantala, M.J. *et al.* (2006) Defoliating insect immune defense interacts with induced plant defense during a population outbreak. *Ecology*, **87**, 291-296.
- Karimzadeh, J. & Wright, D.J. (2008) Bottom-up cascading effects in a tritrophic system: interactions between plant quality and host-parasitoid immune responses. *Ecological Entomology*, **33**, 45-52.
- Klemola, N., Klemola, T., Rantala, M.J. *et al.* (2007) Natural host-plant quality affects immune defence of an insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123**, 167-176.

- Kraaijeveld, A.R., Limentani, E.C. & Godfray, H.C.J. (2001) Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **268**, 259-261.
- Lai, S.C., Chen, C.C. & Hou, R.F. (2002) Immunolocalization of prophenoloxidase in the process of wound healing in the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **39**, 266-274.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Lee, K.P., Simpson, S.J., & Wilson, K. (2008) Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology*, **22**, 1052-1061.
- Linder, J.E., Owers, K.A. & Promislow, D.E.L. (2008) The effects of temperature on host-pathogen interactions in *D. melanogaster*: who benefits? *Journal of Insect Physiology*, **54**, 297-308.
- Lynn, D.C. & Vinson, S.B. (1977) Effect of temperature, host age, and hormones upon the encapsulation of *Cardiochiles nigriceps* eggs by *Heliothis* spp. *Journal of Invertebrate Pathology*, **29**, 50-55.
- Nappi, A.J. & Christensen, B.M. (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, **35**, 443-59.
- McNeil, J., Cox-Foster, D., Gardner, M. *et al.* (2010) Pathogenesis of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* and mechanisms of developmental resistance. *Journal of General Virology*, **91**, 1590-1600.
- Moreau, J., Benrey, B. & Thiery, D. (2006a) Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? *Functional Ecology*, **20**, 592-600.
- Moreau, J., Benrey, B. & Thiery, D. (2006b) Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European Grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Bulletin of Entomological Research*, **96**, 205-212.
- Moreau, J., Villemant, C., Benrey, B. *et al.* (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): the influence of region and cultivar. *Biological control*, **54**, 300-306.
- Ode, P.J. 2006. Plant chemistry and natural enemy fitness: Effects on herbivore and natural enemy interactions. *Annual Review of Entomology*. **51**, 163-185.

- Ojala, K., Julkunen-Tiitto, R., Lindström, L. *et al.* (2005) Diet affects the immune defence and life-history traits of an Arctiid moth *Parasemia plantaginis*. *Evolutionary Ecology*, **7**, 1153-1170.
- Panzavolta, T. (2007) Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. *Environmental Entomology*, **36**, 1054-1058.
- Rantala, M.J., Kortet, R., Kotiaho, J.S. *et al.* (2003a) Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology*, **17**, 534–540.
- Rantala, M.J., Kortet, R. & Vainikka, A. (2003b) The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 2257-2261.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. *et al.* (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology*, **97**, 186-350.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. (2003) Invertebrate Ecological Immunology. *Science*, **301**, 472-475.
- Ryder, J.J. & Siva-Jothy, M.T. (2001) Quantitative genetics of immune function and body size in the house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 646-653.
- Sadd, B.M. & Schmid-Hempel, P. (2009) Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications*, **2**, 113-121.
- Schmid-Hempel, P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual review of entomology*, **50**, 529-51.
- Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y. *et al.* (2009) Introduction. Ecological immunology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B, Biological sciences*, **364**, 3-14.
- Shikano, I., Ericsson, J.D., Cory, J.S. *et al.* (2010) Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. *Basic and Applied Ecology*, **11**, 15-22.
- Siva-Jothy, M.T. & Thompson, J.J.W. (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology*, **27**, 206-212.
- Siva-Jothy, M.T., Moret, Y. & Rolff, J. (2005) Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. *Advance in Insect Physiology*, **32**, 1-48.

- Smilanich, A.M., Dyer, L.A., Chambers, J.Q. *et al.* (2009) Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecology Letters*, **12**, 612-21.
- Strand, M.R. & Pech, L.L. (1995) Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, **40**, 31-56.
- Strand, M.R. (2008) The insect cellular immune response. *Insect Science*, **15**, 1-14.
- Timmermann, S.E. & Briegel, H. (1999) Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *Differentiation*, **45**, 461-470.
- Thiéry, D. & Moreau, J. (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, **143**, 548-557.
- Thompson, S.N., Redak, R.A. & Wang, L.W. (2005) Host nutrition determines blood nutrient composition and mediates parasites developmental success: *Manduca sexta* L. parasitized by *Cotesia congregata* (Say). *The Journal of Experimental Biology*, **208**, 625–635.
- Vogelweith, F., Thiéry, D., Quaglietti, B. *et al.* (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology*, **25**, 1241-1247.
- Zuk, M. & Stoehr, A.M. (2002) Immune defense and host life history. *The American naturalist*, **160 Suppl**, 9-22.
- Yang, S., Ruuhola, T. & Rantala, M.J. (2007) Impact of starvation on immune defense and other life-history traits of an outbreaking geometrid, *Epirrita autumana*: a possible causal trigger for the crash phase of population cycle. *Annales Zoolici Fennici*, **44**, 89-96.

## ANNEXE 2

# HOST PLANT VARIATION PLASTICALLY IMPACTS DIFFERENT TRAITS OF THE IMMUNE SYSTEM OF A PHYTOPHAGOUS INSECT

VOGELWEITH, F.<sup>1</sup>, THIERY, D.<sup>2</sup>, QUAGLIETTI, B.<sup>1</sup>, MORET, Y.<sup>1</sup> & MOREAU, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup>INRA UMR 1065 Save, Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France

**Key-words:** antimicrobial activity, enzymatic cascade of prophenoloxidase, *Eupoecilia ambiguella*, grapes, haemocytes, immune challenge, larval diet, larval immune defence

Functional Ecology



Functional Ecology 2011

doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01911.x

## Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect

Fanny Vogelweith<sup>\*1</sup>, Denis Thiéry<sup>2</sup>, Bastien Quaglietti<sup>1</sup>, Yannick Moret<sup>1</sup> and Jérôme Moreau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Bourgogne, Equipe Ecologie-Evolutive, UMR 5561 Biogéosciences, 6 Bd Gabriel, F-21000 Dijon, France; and <sup>2</sup>UMR INRA1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Centre de recherches de Bordeaux-Aquitaine, Institut des Science de la Vigne et du Vin, B.P.81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

### 1. INTRODUCTION

In tritrophic systems between plants, phytophagous insects and natural enemies, host plant variation is often key to the effects of the relative performance of both the herbivore and its associated natural enemies (Awmack & Leather 2002; Tedder & Tammaru 2002). The bottom-up effect of host plants could be positive for all upper trophic levels. For instance, highly nutritional or/and less defended plants could increase the performance of both the herbivores and their natural enemies (Awmack & Leather 2002; Coley *et al.* 2006). In contrast, the quality of the plant may differentially affect the performance of herbivorous insects and their natural enemies. For example, nutrient deficiencies or/and toxic defensive compounds of the plants could slow-down the development of herbivorous insects, thus

extending the window of vulnerability for attacks by natural enemies (Benrey & Denno 1997). Plant quality may also alter herbivorous insect condition (Singer *et al.* 2004; Coley *et al.* 2006; Smilanich *et al.* 2009) making them more vulnerable to entomopathogens and parasitoids (Cory & Hoover 2006).

Recently, it has been proposed that plant-mediated resistance of herbivorous insects to pathogens and parasitoids could result from alterations of the insect immune function (Karimzadeh & Wright 2008). Insect immunity relies on a suite of systemic responses to combat a wide array of pathogens (Cherry & Silverman 2006) that involve constitutive and inducible mechanisms. Constitutive defenses rely on the insect haemocytes and rapidly activated enzyme cascades such as the phenoloxidase (Söderhäll & Cerenius 2004; Siva-Jothy *et al.* 2005). The baseline of these immune effectors could be impaired during starvation periods (Siva-Jothy and Thompson 2002) or when exposed to protein deficient food sources (Lee *et al.* 2008). Hence, phytophagous insects reared on host plants differing in nutritional values are expected to differ in their baseline levels of constitutive defenses. Recent studies testing this hypothesis by directly measuring levels of some of these immune effectors or related resistance provided contrasting results, with some studies finding an effect of the host plant (Alaux *et al.* 2010, Klemola *et al.* 2007, Bukovinsky *et al.* 2009, Shikano *et al.* 2010) while other studies found no effect (Karimzadeh & Wright 2008, Klemola *et al.* 2008). Associated with this constitutive line of defenses, is the induced response, which consists of a suite of antimicrobial peptides (Iwanaga & Lee 2005), produced within the first three hours following the immune challenge (Lavine *et al.* 2005) and persisting for weeks in a variety of insects (see Haine *et al.* 2008 for review). This induced line of defense adds to the complexity of the insect immune system as its activation could potentially trade-off with the maintenance of other immune pathways (Moret 2003), especially the phenoloxidase activity (Moret & Schmid-Hempel 2009). Herbivorous insects contact the microbial community harboured by their host plants while feeding (Schoonhoven *et al.* 2008) and induced antimicrobial activity may therefore be an important component during this process. Due to the trade-off between the induced response (i.e. antimicrobial activity) and the constitutive line of defenses (i.e. phenoloxydase activity), we suggest that a high activity of antimicrobial activity is associated with the down regulation of the prophenoloxidase (PPO) system. As other studies (Alaux *et al.* 2010, Klemola *et al.* 2007, Bukovinsky *et al.* 2009, Shikano *et al.* 2010) did not consider the induced line of defenses, the variability in the PPO system they found could be due to this

trade-off mediated by the host plant. Therefore, we believe it is crucial to consider together these two lines of defence in one study.

Here, we investigated the influence of host plant variation on baseline levels of a large range of constitutive (haemocyte concentration, PPO system activity) and inducible immune defenses (antimicrobial activity). We also studied the capacity of the immune system to respond against a pathogen attack. To do this, we measure the recruitment of haemocytes and phenoloxidase activities 24 hours after being artificially immunologically challenged with dead bacteria. To this purpose, we used the European Grape Berry Moth, *Eupoecilia ambiguella* (Lepidoptera, Tortricidae) (Fig. 1), as a target phytophagous insect. *E. ambiguella* is one of the most harmful pests of grapes in Europe. In the present study, the effect of host plant quality variation on insect immunity was investigated by offering five different diets made of different cultivars of grapes to larvae of an inbred strain of *E. ambiguella*. We then searched for potential variation in the baseline concentration of haemocytes, activity of the prophenoloxidase system and antimicrobial activity in the haemolymph of larvae achieved during their development across the five different diets. We also compared the immune responsiveness of larvae across diets by measuring changes in haemocyte concentration and activity of the prophenoloxidase system after a bacterially based benign immune challenge. We expected that plant-induced variation in immune defenses of *E. ambiguella* could be mediated by physiological trade-offs between immune effectors, especially between the induced production of antimicrobial peptides and the activity of the prophenoloxidase system.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### Experimental procedures

Insects used in this study were from an inbred strain of *E. ambiguella* (Fig. 1) from INRA-Bordeaux Aquitaine (France) for several years. Larvae were cultured in groups and maintained under standard laboratory conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  r.h., photoperiod: L16:D8) with *ad libitum* supply of a semi-artificial diet (1000 ml water, 15 g agar, 84.63 g maize flour, 41.25 g wheat germ, 45.48 g yeast, 6.03 g ascorbic acid, 0.32 g Scala<sup>®</sup>, 3.35 g mineral salt, 5 ml ethanol, 2.65 g benzoic acid and 2.76 g Nipagine) (see Thiéry & Moreau 2005).



**Figure 1.** Adult female of our strain European Grape Berry Moth (*Eupoecilia ambiguella*) (left) (Picture P. Goetgeluck & D. Thiéry), and fully grown (5th instar) larva (right) (Picture F. Vogelweith). Larva length is ca. 1 cm.

The influence of different host plants on fitness related traits and immunity in *E. ambiguella* was tested by rearing larvae on artificial diets derived from different host plants. A total of 1466 newly hatched larvae (age < 24 h) were individually allocated at random to five experimental diets made of berries from the following grapevine varieties: ‘Chardonnay’ (CHAR), ‘Chasselas’ (Smilanich et al.), ‘Gewurztraminer’ (GEW), ‘Merlot’ (MER) and ‘Riesling’ (RIE); and a semi-artificial diet (Control, see above). Larvae were maintained until they had reached the fifth larval instar, during which they were checked every second day for survival. Within each treatment group, larvae that reached the fifth larval instar were randomly divided in two lots. In the first lot, individual larvae provided a sample of haemolymph to test for the concentration of haemocytes, the antibacterial activity and the maintenance and use of the prophenoloxidase system when they were unchallenged. In the second lot, larvae were used to test for changes in the concentration of haemocytes and phenoloxidase activities of their haemolymph 24 hours after being immunologically challenged with dead bacteria. Body size of the fifth larval instar was measured from these two samples.

### Experimental diet

Experimental diets were made as described in Thiéry and Moreau (2005) and Moreau *et al.* (2006a; 2006b; 2006c). The recipe of the experimental diets was similar to the semi-artificial one described above except that the amounts of maize flour and wheat germ were 16.93 g and 8.25 g, respectively. To the mixture was added 30 g of freeze-dried deseeded powder of berries (Moreau *et al.* 2006a) obtained from the five grapevine varieties described above. Insecticide free bunches of berries were all collected from the ‘gene collection of grape

plants' 'Domaine de la Grande Ferrade', INRA-Bordeaux Aquitaine at the pre-veraison during the last week of July 2009, which corresponds to the grape phenology on which the second annual generation of *E. ambiguella* occurs. All varieties are cultivated with similar practices in a small vineyard without insecticide in homogeneous pedological characteristics and climatic conditions.

Larvae were individually reared in centrifuge tubes filled with 1.5 ml of diet, which is enough for the larvae to complete development (Thiéry and Moreau 2005). Lids of the tubes were pierced with a needle to allow air circulation.

### **Haemolymph collection and immune challenge**

Individual larvae were chilled on ice for 20 min before a 3 µl sample of haemolymph was collected from a wound in the posterior part of the ventral side of the abdomen using a sterile glass capillary (Hirschmann®Laborgeräte, Eberstadt, Germany). One microlitre was flushed into a micro-centrifuge tube containing 20 µl of cold sodium cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer (0.01M sodium cacodylate; 0.005M CaCl<sub>2</sub>; pH 6.5). Ten microlitres of this solution was immediately used to measure the concentration of haemocytes and the rest was stored at -27°C for later measurement of the phenoloxidase activity. The remaining haemolymph in the capillary (2 µl) was flushed into a N-Phenylthiourea (Sigma P7629) coated micro-centrifuge tube containing 4 µl of cold sodium cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer and stored at -27°C until later examination for antibacterial activity.

Twenty-four hours after being immunologically challenged with dead bacteria (second lot see experimental procedures above), only 1 µl of haemolymph was collected and flushed into a micro-centrifuge tube containing 20 µl of cold sodium cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer to measure the concentration of haemocytes and phenoloxidase activity when unchallenged. This was to test for changes in the larval concentration of haemocytes and phenoloxidase activities of the haemolymph. Then they were immediately immune-challenged with a sterile needle dipped into a concentrated suspension of heat-killed *Arthrobacter globiformis* (about 10<sup>9</sup> cells.ml<sup>-1</sup>) obtained from the Pasteur institute (CIP 105365) to mimic a bacterial infection. This bacterium is commonly used in the protocol testing antimicrobial activity (Moret and Siva-Jothy 2003, Moret 2006, Sadd and Schmid-Hempel 2007). Indeed, *A. globiformis* is sensitive enough to detect antibacterial activity resulting from the production of antibacterial peptides upon an immune challenge. Larvae were then kept in their rearing tubes for 24 hours before a second 1 µl sample of haemolymph was collected to measure again the concentration

of haemocytes and phenoloxidase activity when the individual is immune challenged. Since our purpose was to compare immune activity after an experimental infection across diets, controlling for the effects of wounding was not necessary.

### **Immune parameters**

Concentration of haemocytes was measured using a Neubauer improved haemocytometer under a phase contrast microscope (magnification x 400). The activity of naturally activated phenoloxidase (PO) enzymes only (hereafter PO activity) and the activity of the proenzymes (PPO) in addition to that of the PO (hereafter total-PO activity) were measured using a spectrophotometer following the method described in Cornet *et al.* (2009). Phenoloxidase activity was quantified without further activation, while total activity required the activation of the PPO into PO with chymotrypsin. To this purpose, frozen haemolymph samples were thawed on ice and centrifuged (6500 r.p.m., 15 min, 4°C). Five microlitres of supernatant were added to a microplate well containing 20 µl of PBS and either 140 µl of distilled water to measure PO activity only or 140 µl of chymotrypsin solution (Sigma C-7762, 0.07 mg/ml of distilled water) to measure total-PO activity. Then 20 µl of L-Dopa solution (Sigma D-9628, 4 mg/ml of distilled water) was added to each well. The reaction was allowed to proceed at 30°C in a microplate reader (Versamax, Molecular Devices) for 40 min. Readings were taken every 15 seconds at 490 nm and analysed using the software SOFT-Max®Pro 4.0 (Molecular Devices). Enzyme activity was measured as the slope (V<sub>max</sub> value: change in absorbance unit/min) of the reaction curve during the linear phase of the reaction and reported to the activity of 1 µl of pure haemolymph.

Antimicrobial activity in the haemolymph was measured using a standard zone of inhibition assay (Moret 2006). Samples were thawed on ice and 2 µl of the sample solution were used to measure antimicrobial activity on zone of inhibition plates seeded with *A. globiformis*. *A. globiformis* from a single colony on a streak plate were incubated overnight at 30°C in broth medium (10 g bacto-tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl in 1000 ml of distilled water, pH 7.0). From this culture, bacteria were added to broth medium containing 1% agar to achieve a final density of 10<sup>5</sup> cells/ml. Six millilitres of this seeded medium was then poured into a Petri dish and allowed to solidify. Sample wells were made using a Pasteur pipette fitted with a ball pump. Two microlitres of sample solution was added to each well, and a positive control (Tetracycline: sigma T3383) was included on each plate. Plates were

then incubated for 48 hours at 30°C, after which the diameter of inhibition zones were measured for each sample.

### **Body size**

Body size of the larvae was estimated by measuring the distance between the most distant lateral sides of the head capsule margins (Delbac *et al.* 2010) using a Nikon SMZ-10A stereoscopic microscope and VTO 232 video analysis system (Linkam Scientific Instruments). In *E. ambiguella*, body size is correlated to the age of the larvae (Delbac *et al.* 2010). Therefore, head size is an estimator of larval instars.

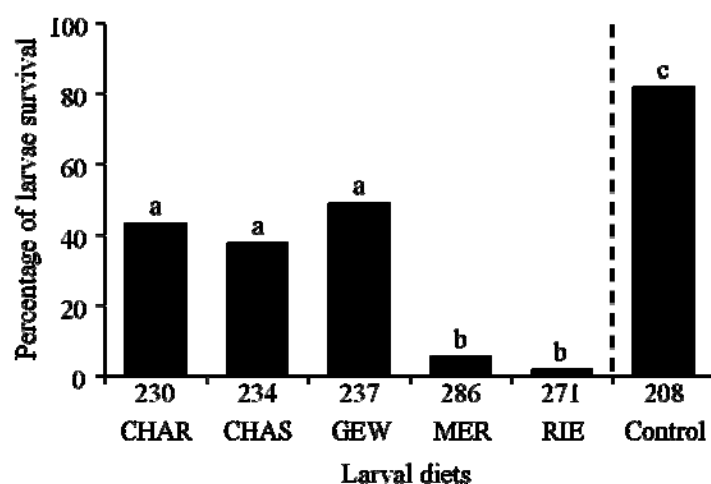
### **Statistical analysis**

Survival of larvae across experimental diets was analysed using a Pearson's  $\chi^2$  test. Data on basal concentration of haemocytes, basal PO, basal total-PO and basal antimicrobial activities could not be satisfactorily transformed to use parametric tests. They were consequently analysed using Wilcoxon's rank tests for potential difference between experimental diets. Significance levels for multiple comparisons were adjusted using Bonferroni's sequential correction. Immune responsiveness of larvae challenged with dead bacteria were analysed using analyses of variance for repeated measures (repeated ANOVA) with haemocyte concentration, PO and total-PO as dependent variables, experimental diet as factors and body size as covariate. For these latter analyses, the best statistical models were scanned using a stepwise backward procedure from initial models that included all main effects and interactions. All statistical tests were performed using the JMP software (Version 3.2.2, SAS institute Inc.).

## **3. RESULTS**

### **Survival of larvae**

Larval survival to the fifth instar was significantly variable among experimental diets (Fig. 2;  $\chi^2$  Pearson:  $\chi^2_5 = 471.54$ ,  $P < 0.0001$ ). Larvae reared on Riesling and Merlot diets suffered the highest mortality whereas those reared on the control diet had the highest survival (Fig. 2). Survival on Chardonnay, Chasselas and Gewurztraminer diets was around 45% but did not differ from each other (Fig. 2).



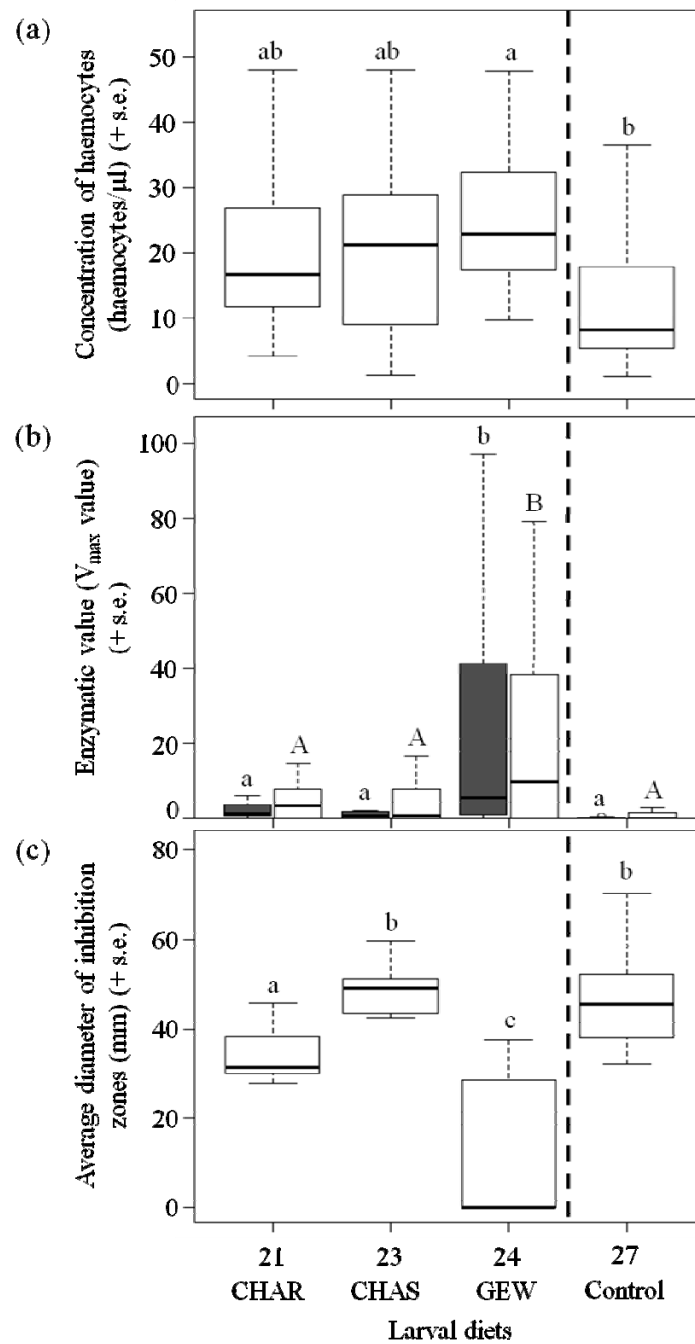
**Figure 2.** Percentage of larvae survival from hatching to the fifth instar according to diets. Diets with the same lowercase letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). The number of larvae tested on each diet appears below the x-axis.

### Immune parameters

Survival of the larvae on Riesling and Merlot diets was very low. Consequently, there were not enough larvae available to measure immune parameters and data on immune defenses, therefore results below only refer to larvae reared on control, Chardonnay, Chasselas and Gewurztraminer diets.

#### *Basal levels of haemocyte concentration, PO and total-PO and, antimicrobial activity*

Although not significant, concentration of haemocytes of larvae from Chardonnay, Chasselas and Gewurztraminer diets tended to be dissimilar (Wilcoxon test:  $\chi^2_2 = 5.46$ ,  $P = 0.065$ ). When adding the control diet, variation became significant ( $\chi^2_3 = 25.69$ ,  $P < 0.0001$ ) mainly because larvae of the control diet exhibited the lowest concentration of haemocytes (Fig. 3a).



**Figure 3.** (a) Concentration of haemocytes (haemocytes/ $\mu$ l) ( $\times 10^3 + \text{s.e.}$ ) of fifth instar larvae, (b) PO (grey plot) and total-PO (white plot) activities of larvae haemolymph ( $V_{\max}$  value) ( $\times 10^3 + \text{s.e.}$ ), and (c) average diameter of inhibition zones (mm) ( $+ \text{s.e.}$ ), representative of antimicrobial activity in 1  $\mu$ l of haemolymph according to diet on which larvae were reared. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles; the central features, the medians; and maxima and minima by dashed lines. Diets with the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). The number of larvae tested on each diet appears below the x-axis.

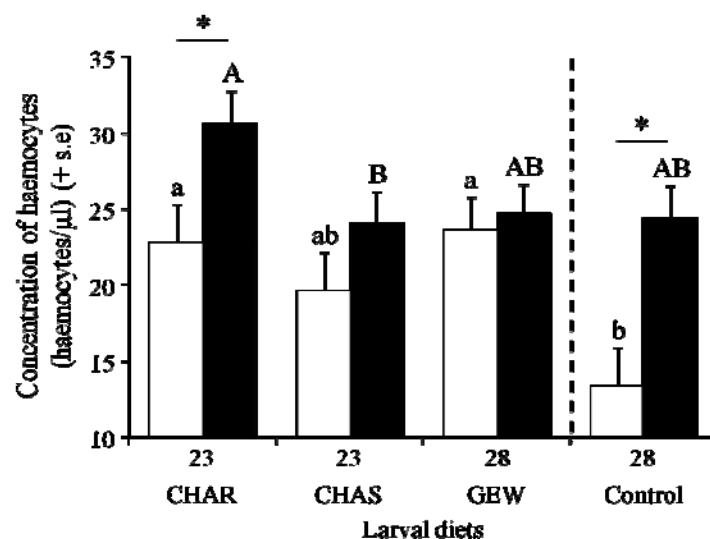
Phenoloxidase and total-PO activities of larvae were significantly different among experimental and control diets (PO:  $\chi^2_3 = 27.96$ ,  $P < 0.0001$ ; Total-PO:  $\chi^2_3 = 23.25$ ,

$P < 0.0001$ ). Both enzymatic activities were significantly higher in larvae from the Gewurztraminer diet than in those of the three other diets, which were not significantly different (Fig. 3b).

Antimicrobial activity of larvae was significantly variable among the three experimental and the control diets (Wilcoxon test:  $\chi^2_3 = 18.2$ ,  $P = 0.0004$ ; Fig. 3c). Antibacterial activity of larvae reared on Gewurztraminer diet had the lowest antimicrobial activity and those reared on Chasselas diet had the highest one (Fig. 3c). Antibacterial activity of larvae of the control diet was similar to those of the Chasselas diet but was significantly lower than those of the two other experimental diets (Fig. 3c).

### *Immune challenge*

Concentration of haemocytes was similar among larvae from experimental and control diets (Fig. 4; Table 1). Whatever the food treatment, concentration of haemocytes covaried positively with the larval age (Table 1). Interestingly, only larvae from the control and the Chardonnay diets exhibited an enhancement of their concentration of haemocytes in response to the immune challenge as suggested by the significant interaction term between diet and time in table 1 (Fig. 4).



**Figure 4.** Variation of concentration of haemocytes (haemocytes/μl) ( $\times 10^3$ ) immediately (white bars) and 24 hours (black bars) after the immune challenge according to diet. Diets with the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). Lowercase letters refer to the concentration of haemocytes immediately before the immune challenge and capital letters refer to the concentration of haemocytes 24 hours after. An asterisk denotes a significant change in the concentration of haemocytes during the immune challenge ( $P < 0.05$ ). The number of larvae tested on each diet appears below the x-axis.

**Table 1.** Results of the analysis for repeated measures of haemocytes, PO and total-PO activities. Values  $P \leq 0.05$  are given in bold.

|                           | Haemocytes  |               | PO activity |              | Total-PO activity |              |
|---------------------------|-------------|---------------|-------------|--------------|-------------------|--------------|
| Source                    | <i>F</i>    | <i>P</i>      | <i>F</i>    | <i>P</i>     | <i>F</i>          | <i>p</i>     |
| Between subjects          |             |               |             |              |                   |              |
| Diet <sub>3,90</sub>      | 0.07        | 0.18          | 1.15        | 0.33         | 1.54              | 0.21         |
| Age <sub>1,90</sub>       | <b>0.18</b> | <b>0.0001</b> | <b>9.68</b> | <b>0.002</b> | <b>9.37</b>       | <b>0.003</b> |
| Within subjects           |             |               |             |              |                   |              |
| Time <sub>1,90</sub>      | 0.01        | 0.28          | 0.03        | 0.86         | 0.35              | 0.55         |
| Time*Diet <sub>4,90</sub> | <b>0.1</b>  | <b>0.04</b>   | 0.64        | 0.59         | 0.84              | 0.47         |
| Time*Age <sub>1,90</sub>  | 0.006       | 0.46          | 0.05        | 0.81         | 0.37              | 0.54         |

There were no significant temporal change in PO and total-PO within 24 hours post immune challenge and no significant variation among experimental and control diets (Table 1). Both enzyme activities positively covaried with age of the larvae (Table 1).

#### 4. DISCUSSION

Our study aimed to investigate the influence of host plant variation on immune defenses of herbivorous insects. Because variation in host plant were previously shown to affect resistance of herbivorous insects to natural enemies (Moreau *et al.* 2010), we have hypothesized that variation in host plant could plastically affect the expression of their immune defenses. Consistent with our prediction, we found that an inbred strain of the moth, *E. ambiguella*, exhibited variable patterns of expression of immune defenses when reared on different semi-artificial diets made of berries from different grapevine cultivars.

Here, all the diets used had similar physical characteristics (e.g. density, solubility and water contents), in contrast to having used entire berries. Therefore, variation in levels of immune defenses of larvae reared on the different diets resulted only from chemical differences between the cultivars.

The control diet was the most favourable for larvae survival. Interestingly, those larvae exhibited the lowest levels of immune defenses, except for antimicrobial activity. Maintaining and investing in immunity is known to be costly (Moret & Schmid-Hempel

2000) and such a cost could potentially explain the reduced survival of larvae in the experimental diets, which also exhibited relatively high levels of immune defenses. Levels of immune defense were also variable among the experimental diets. Notably, larvae reared on the Gewurztraminer diets exhibited high PO activities but low antimicrobial activity, as opposed to those reared on Chardonnay and Chasselas diets. Antimicrobial activity in the haemolymph results from the inducible production of antimicrobial peptides after a microbial immune challenge (Hoffmann *et al.* 1996; Haine *et al.* 2008) and is associated with the down regulation of the PPO system in other insect models (Moret & Schmid-Hempel 2009). Our results show that this immune pathway has been fully activated in larvae of the Chardonnay, Chasselas and control diets and was accompanied with a probable down regulation of the PPO system as compared to larvae reared of the Gewurztraminer diet. Insects recognize bacteria through the presence of conserved molecules on their cell wall called “Microbe-associated molecular patterns” (MAMPs). These molecules are recognized Patterns Recognition Receptors (PPRs) expressed by host cells, thereby triggering either the prophenoloxidase cascade or the synthesis of antimicrobial peptides (Yoshida *et al.* 1996). The regulation of both immune pathways could thus be mediated by these PPRs. However this would need further investigations. Antimicrobial activity in larvae might have been induced through the consumption of microorganisms that are likely growing in the food pellet. While the diets contain Scala® to limit fungal growth, they are not fully aseptic. Differences in larval antimicrobial activity among diets suggest that chemicals contained in the berries from the different cultivars act like antibiotics. Variation in these chemicals may differentially limit microbial growth in diets and therefore the activation of the antimicrobial activity in the haemolymph. Gewürztraminer berries are likely to contain more antibiotics than those of the other cultivars. Further study in comparing antibiotic activity of berries from different grapevine cultivars is needed to investigate their potential effects.

Antibiotic chemicals in host plants may indirectly provide protection against microbial pathogens to herbivorous insects, which could then maintain higher levels of immune defense against a range of other pathogens. It is probably the case for the larvae reared on the Gewurztraminer diet, which does not appear constrained by the use of their antimicrobial defenses in favour of the PPO system. This latter immune pathway is highly involved in the immune protection against macro-parasites and parasitoids (Lavine & Strand 2002; Rolff & Reynolds 2009).

Larvae reared on different experimental diets also exhibited variable ability to develop an immune response through the recruitment of haemocytes after an immune challenge. Larvae grown on Chardonnay and control diets significantly enhanced the concentration of haemocytes in their haemolymph upon immune challenge whereas those grown on Chasselas and Gewurztraminer diets did not. The strong recruitment of haemocytes after an immune challenge has already been found in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Shikano *et al.* 2010). Either chemicals from Chardonnay and control diets had boosted larval immune responsiveness or, in contrast, chemicals from Chasselas and Gewurztraminer diets altered the recruitment of haemocytes in larvae upon challenge. Future work will examine the potential positive and negative effects of chemicals from the berries of the different cultivars on immunity of the European Grape Berry Moth, *E. ambiguella*. The outcome of such a study should illustrate whether the interactions between immunity of the herbivorous insect and its host plant result from an “arm race”.

Toxic effects of the host plants look obvious when considering the high mortality of larvae on Merlot and Riesling diets. Such a toxic effect of Riesling berries may not come as a surprise because similar results were obtained on *L. botrana* (another grapevine pest) (Moreau *et al.* 2007). However, an eventual toxic effect of Merlot berries on this species has so far never been observed.

Finally, our results also highlight that older larvae have a higher immune potential (concentration of haemocytes, PO and total-PO activities) than younger larvae. Our result support previous results demonstrating that insect larvae become more immunocompetent with age, which may partly explain why parasitoids and parasites are more successful in infecting young host larvae (Vinson 1990; Brodeur & Vet 1995).

To conclude, we found that variation in host plant varieties within the same species, grown on the same soil strongly affects the expression of immune defense levels in an inbred strain of the European Grape Berry moth, *E. ambiguella*. Previous works found that varying host plant species affect levels of some immune defenses in other herbivorous insects (Klemola *et al.* 2007; Karimzadeh & Wright 2008; Klemola *et al.* 2008; Lee *et al.* 2008; Bukovinszky *et al.* 2009; Smilanich *et al.* 2009). In our study, we consider within species variation of the host plant on several immune parameters that are, together, presumably relevant to the insect’s immunocompetence to a large range of pathogens (from micro to macro parasites). Patterns of variation of immune defenses across diets are likely plastic and were partly mediated by existing physiological trade-offs between immune pathways, at least

between induced antibacterial defenses and the PPO system (Moret & Schmid-Hempel 2009). Further analyses will be required to reveal the causes of this variation in levels of immune defenses across host plants. Results of this study could have implications for the evolution of plant-herbivore-parasitoid interactions (Moreau *et al.* 2009; 2010). Indeed, they tend to emphasize an important role of the immune system and its variation, according to the host plant variation in bottom-up processes involving plants. For instance, alteration of herbivorous insect immunity by the host plant could be of major importance as it should determine the ability of natural enemies to control the herbivorous insect population and therefore the damage to the host plant.

### Acknowledgments

We thank Dr G. Wegner-Kiss for providing the initial moth strain, M.-E. Toulouse, L. Delbac for insect culture, D. Newcombe and M. Gillingnam for comments in the last version of the manuscript. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseil Régional of Aquitaine and the Conseil Régional of Bourgogne.

### References

- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Le Conte, Y. (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, **6**, 562-565.
- Awmack, C.S. & Leather, S.R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, **47**, 817-844.
- Benrey, B. & Denno, R. (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology*, **78**, 987-999.
- Brodeur, J. & Vet, L.E.M. (1995) Relationships between parasitoid host range and host defence: a comparative study of egg encapsulation in two related parasitoid species. *Physiological Entomology*, **20**, 7-12.
- Bukovinszky, T., Poelman, E.H., Gols, R., Prekatsakis, G., Vet, L.E.M., Hervey, J.A. & Dicke, M. (2009) Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immune defence of a herbivore against parasitism. *Oecologia*, **160**, 299-308.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **199**, 116-126.

- Cherry, S. & Silverman, N. (2006) Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend. *Nature Immunology*, **7**, 911-917.
- Coley, P.D., Bateman, M.L. & Kursar, T.A. (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*, **115**, 219-228.
- Cornet, S., Biard, C. & Moret, Y. (2009) Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia*, **159**, 257-269.
- Cory, J.S. & Hoover, K. (2006) Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**, 278-286.
- Delbac, L., Lecharpentier, P. & Thiéry, D. (2010) Larval determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Protection*, **29**, 623-630.
- Haine, E.R., Moret, Y., Siva-Jothy, M.T. & Rolff, J. (2008) Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Sciences*, **322**, 1257-1259.
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. & Hetru, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology*, **8**, 8-13.
- Iwanaga, S. & Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 128-150.
- Karimzadeh, J. & Wright, D.J. (2008) Bottom-up cascading effects in a tritrophic system: interactions between plant quality and host-parasitoid immune responses. *Ecological Entomology*, **33**, 45-52.
- Klemola, N., Kapari, L. & Klemola, T. (2008) Host plant quality and defence against parasitoids: no relationship between levels of parasitism and geometrid defoliator immunoassay. *Oikos*, **117**, 926-934.
- Klemola, N., Klemola, T., Rantala, M.J. & Ruuhola, T. (2007) Natural host-plant quality affects immune defence of an insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123**, 167-176.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Lavine, M.D., Chen, G. & Strand, M.R. (2005) Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 1335-1346.
- Lee, K.P., Simpson, S.J. & Wilson, K. (2008) Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology*, **22**, 1052-1061.

- Lowenberger, C. (2001) Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Molecular Biology*, **31**, 219-229.
- Moreau, J., Arruego, X., Benrey, B. & Thiéry, D. 2006a. Differences in nutritional quality of parts of *Vitis vinifera* berries affect fitness of the European grapevine moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **119**, 93-99.
- Moreau, J., Benrey, B. & Thiéry, D. (2006b) Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, **96**, 205-212.
- Moreau, J., Benrey, B. & Thiéry, D. (2006c) Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? *Functional Ecology*, **20**, 592-600.
- Moreau, J., Thiéry, D., Troussard, J.P. & Benrey, B. (2007) Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, **32**, 747-753.
- Moreau, J., Richard, A., Benrey, B. & Thiéry, D. (2009) Host plant cultivar of the grapevine moth *Lobesia botrana* affects the life history traits of an egg parasitoid. *Biological Control*, **50**, 117-122.
- Moreau, J., Villemant, C., Benrey, B. & Thiéry, D. (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): the influence of region and cultivar. *Biological control*, **54**, 300-306.
- Moret, Y. (2003) Explaining variable costs of the immune response: selection for specific versus non-specific immunity and facultative life history change. *Oikos*, **102**, 213-216.
- Moret, Y. (2006) 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **273**, 1399-1405.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2000) Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, **290**, 1166-1168.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2009) Immune responses of bumblebee workers as a function of individual and colony age: senescence versus plastic adjustment of the immune function. *Oikos*, **118**, 371-378.
- Rolff, J. & Reynolds, S. (2009) Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology, and Mechanisms. Oxford University Press, Oxford.
- Sadd, B.M. & Schmid-Hempel, P. (2007) Facultative but persistent transgenerational immunity via the mother's eggs in bumblebees. *Current Biology*, **17**, 1046-1047.

- Schoonhoven, L.M., van Loon, J.J.A. & Dicke, M. (2008) *Insect-plant Biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Shikano, I., Ericsson, J.D., Cory, J.S. & Myers, J.H. (2010) Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. *Basic and Applied Ecology*, **11**, 15-22.
- Singer, M.S., Carrière, Y., Theuring, C. & Hartmann, T. (2004) Disentangling food quality from resistance against parasitoids: Diet choice by a generalist caterpillar. *American Naturalist*, **164**, 423-429.
- Siva-Jothy, M.T., Moret, Y. & Rolff, J. (2005) Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology*, **32**, 1-48.
- Siva-Jothy, M.T. & Thompson, J.J.W. (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology*, **27**, 206-212.
- Smilanich, A.M., Dyer, L.A., Chambers, J.Q. & Bowers, M.D. (2009) Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecology Letters*, **12**, 612-621.
- Teder, T. & Tammaru, T. (2002) Cascading effects of variation in plant vigour on the relative performance of insect herbivores and their parasitoids. *Ecological Entomology*, **27**, 94-104.
- Thiéry, D. & Moreau, J. (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, **143**, 548-557.
- Vinson, S.B. (1990) How parasitoids deal with the immune system of their hosts: an overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **13**, 3-27.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. & Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 13854-13860.

## ANNEXE 3

# FOOD-MEDIATED MODULATION OF IMMUNITY IN A PHYTOPHAGOUS INSECT: AN EFFECT OF NUTRITION RATHER THAN PARASITIC CONTAMINATION

VOGELWEITH, F.<sup>1</sup>, MOREAU, J.<sup>1</sup>, THIERY, D.<sup>2</sup> & MORET, Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup>INRA UMR 1065 Save, Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France

Key-words: antibiotics, *Eupoecilia ambiguella*, immune trade-off, grape varieties.

## 1. INTRODUCTION

Immune defence is an important phenomenon in biology, with profound implications for individual organisms and the functioning of ecological systems. Immune defence regulates the full spectrum of interactions with symbionts by either clearing infecting organisms that are harmful or by limiting the cost of responding to organisms that can be tolerated and allowing microbes that are beneficial. Because immunity is costly to maintain and use, the activation of the immune system can reduce the performance of other non-immunologically physiologies (Armitage et al. 2003). Conversely, other physiological demands may compromise immune performance. In addition, the immune system itself is multifaceted and may exhibit trade-offs between its branches. Hence, the T helper cell response of the vertebrate immune system directed towards microparasites (T helper cell response type 1) is compromised when the T helper cell response directed towards macroparasites (T helper cell response type 2) is activated and vice versa (Fenton, Lamb & Graham 2008).

Trade-offs between arms of the invertebrate immune system have also been suggested. The invertebrate immune system involves humoral antimicrobial peptides that are used to combat microbial infection (Imler & Bulet 2005) and the prophenoloxidase (PPO) system, a component of the oxidative and melanisation defences employed against eukaryotic parasites (Cerenius & Soderhall 2004). Negative correlations these two components of the invertebrate immune system were observed in bumble bees (Moret & Schmid-Hempel 2009), the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Freitak et al. 2007) and the European grape berry moth, *Eupoecilia*

*ambiguella* (Vogelweith et al. 2011). Theory suggests that hosts ought to invest in defence according to the risk of infection, or allocate defence in response to the most fitness-threatening parasite (Graham 2001; Moret 2003). These changes in relative expression between immune effectors may result from selection across host generations, but might also result from plastic modulations of the immune system within individuals in response to the current pathogenic threat.

Herbivorous insects developing on various host plants are likely exposed to variable abundance and diversity of microbes located on the plant surface, in fruits and seeds. The consumption of microbes in the food is known to affect the expression of different arms of the insect immune system (Freitak et al. 2007). However these adjustments between immune defences systems might be dependent on the host plant ability to control their local microbial community. Chemicals often produced from the secondary metabolism in plant host involve antibiotics substances controlling microbial development in the plant (Visser 2011). Hence, variation in these chemicals may differentially limit microbial growth in the plant consumed by phytophagous insects, which will be then exposed to different levels of microbial threat. Changes between immune defences within the phytophagous insect immune system are therefore expected to be indirectly dependent on host plant levels of antimicrobial activity.

Independently of being a source of microbial infection, food abundance and quality seem important modulators of the host immune response. For instance, food deprivation leads to reduced immune responsiveness (Siva-Jothy & Thompson 2002), lower resistance to pathogenic infection (Feder et al. 1997) and sometime higher tolerance (Ayres & Schneider 2009). Furthermore, variation in macronutrient intake such as proteins and carbohydrates in the food could strongly affect immune traits (Povey et al. 2009; Cotter et al. 2011). Other dietary substances such as carotenoids have also been found to influence the immune response of both vertebrates (Chew & Park 2004) and invertebrates (Babin, Biard & Moret 2010).

Hence, it appears obvious that variation in immune defences and resistance to pathogens among phytophagous insects observed in the field is partly host plant-dependent either through their antibiotics contains or nutritive quality. In this study we aim at disentangling the influence of host plant antibiotic activity to this of their nutritive quality on immune defences of the European grape berry moth, *Eupoecilia ambiguella* (Lepidoptera: Tortricidae). *E. ambiguella* is one of the major grape pests in Europe that develop on several vine cultivars. Levels of expression between the PPO system and antimicrobial activity in the

haemolymph of five instar larvae were found to be dependent of the vine cultivars the insect was growing on (Vogelweith et al. 2011). The presence of microbes on the surface and in grape berries is clearly established (Renouf, Claisse & Lonvaud-Funel 2005). The surface of grapes represents a phyllospheric habitat containing yeast, bacteria, fungus (Boe 2005) varying with climatic conditions, viticultural practices etc. (Barata, Malfeito-Ferreira & Loureiro 2012). To control these microbes, grape berries produced several antimicrobial peptides (AMPs) constitutively or in response to infection (Visser 2011). Grape varieties exhibit variation in their susceptibility to microbial infection. For instance, Chardonnay growing in South Africa is highly susceptible to crown gall development (Burr et al. 1998) whereas Pinot Noir seems protected through the production of a berry-specific defensin providing antifungal activity (de Beer & Vivier 2008).

Here, we reared *E. ambiguella* larvae on artificial diets containing different concentrations of tetracycline (mimicking natural levels of antimicrobial activity in berries of different grape varieties) or bacteria to investigate the influence of plant microbial control using antibiotic substances on the phytophagous insect immune system, independently of the plant nutritional quality. Other groups of larvae were reared on berries-enriched diets, as control for tetracycline diets for comparison. At the end of the larval stage, we measured constitutive (haemocyte count, PO and total-PO activity) and induced (antimicrobial activity) immune parameters. If the presence of antimicrobial activity in the diets matters, we expected that diets containing antimicrobial activity and controlling microbial growth on the diet will favor the maintenance of high levels of PPO activity in the haemolymph of larvae. Conversely, the absence of antimicrobial activity in the diet should favor the development of microbes in the diet, which should stimulate antimicrobial activity in the haemolymph of larvae at the expense of the PO-PPO system.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **a) Insect model and experimental design**

Insects used in this study were from an inbred stock maintained at the INRA-Bordeaux Aquitaine (France) for several years and descended from individuals collected in Sauternes vineyard (western France). Larvae were maintained in boxes (18 × 11.5 × 7 cm) under standard laboratory conditions (22 ± 1°C, 70 ± 10% r.h., photoperiod: L16:D8) with *ad libitum* supply of a semi-artificial diet (1000 ml water, 15 g agar, 84.63 g maize flour, 41.25 g

wheat germ, 45.48 g yeast, 6.03 g ascorbic acid, 0.32 g Scala®, 3.35 g mineral salt, 5 ml ethanol, 2.65 g benzoic acid and 2.76 g Nipagine) (Thiery and Moreau 2005b) density of 100 individuals per 300 ml of diet.

The first parts of this study consisted in measuring levels of antimicrobial activity in berries of six grape varieties and convert it to equivalent of tetracycline concentration. Bunches of berries were collected from the ‘gene collection of grape plants’ ‘Domaine de la Grande Ferrade’, INRA-Bordeaux Aquitaine at the pre-veraison stage during the last week of July 2010 (which corresponds to the grape phenology on which the third annual generation of *E. ambiguella* occurs). All grape varieties were cultivated using similar practices in a small vineyard without insecticide, with homogeneous pedological characteristics and climatic conditions. We collected berries of Chardonnay, Chasselas, Gewurztraminer, Merlot, Pinot Noir and Riesling.

For practical reasons, only two grape varieties with the most contrasted levels of antimicrobial activity were then used as reference for the preparation of experimental diets to which larvae of *E. ambiguella* were exposed. A total of eight experimental diets were prepared. Two experimental diets were made from berries of the two selected grape varieties, which are expected to be relevant of the differences in nutritional quality and levels of antibiotic activity. Two experimental diets were prepared without berries but with tetracycline concentration that mimicked the difference in level of antimicrobial activity previously found in the two grape varieties, but with the same nutritional quality. Two additional diets with larger concentrations of tetracycline were prepared as controls for the effect of the antibiotic chemical. One diet was prepared without tetracycline but was inoculated with a high concentration of live bacteria to mimic food highly contaminated with microbes. Finally, one diet was prepared without tetracycline and without bacteria as control.

Newly hatched larvae (age < 24 h) were individually allocated at random to these eight experimental diets. Larvae were individually reared in centrifuge tubes filled with 1.5 ml of diet, which is enough for the larvae to complete development (Thiery & Moreau 2005). Lids of the tubes were pierced with a needle to allow air circulation. Larvae were maintained until they had reached the 5<sup>th</sup> larval instar, during which they were checked every second day for survival. Individual larvae provided a sample of haemolymph on which for the concentration of haemocytes, antibacterial activity and activity of the PPO system were measured. Body size of the 5th larval instar was measured from these two samples.

### **b) Antimicrobial activity of grape berries**

After removing the seeds, berries were grinded. The antimicrobial activity in the undiluted solution of berries was measured against *Arthrobacter globiformis* using the zone of inhibition assay described in (Vogelweith et al. 2011). Briefly, an overnight culture of *A. globiformis* was used to seed 1% agar plates in which wells were made using a sterilized glass Pasteur pipette. Two microliter of each sample was placed in each well and the plates were incubated at 30°C for 48 hours. After incubation, a clear zone could be seen around the wells where antimicrobial activity of the sample inhibited bacterial growth. The diameter of the clear zone was measured and compared to a standard dilution of a tetracycline solution (0.05 mg.ml<sup>-1</sup>, 0.025 mg/ml, 0.0125 mg.ml<sup>-1</sup>, 0.0083 mg.ml<sup>-1</sup>, 0.00625 mg.ml<sup>-1</sup> and 0.005 mg.ml<sup>-1</sup>) on each plate for the conversion of the antimicrobial activity of the sample into equivalent of tetracycline concentration (See section 3.a; Fig. 1 and 2).

### **c) Artificial diets**

Antimicrobial activity measures from the grape berries showed that the Chardonnay (C) and Pinot Noir (PN) exhibited the most contrasted antimicrobial activity and were therefore selected as reference for the production of diets. The recipe for the control (T) and experimental diets added with tetracycline or bacteria was the same as the one described above. Two diets were enriched with 0.0025 and 0.005 mg of tetracycline per milliliter of diet to mimic levels of antimicrobial activity previously found in berries of Chardonnay (T[C]) and Pinot Noir (T[PN]), respectively. Two diets were added with 0.02 mg (T[0.02]) and 0.04 mg (T[0.04]) per milliliter of diet as controls for the effect of the antibiotic chemical. The diet mimicking food highly contaminated with microbes consisted of control diet (T) inoculated with bacteria ( $\times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup>) previously collected on one-week-old control diet and cultured in broth medium (48 hours at 28°C). Experimental diets made from berries of Chardonnay and Pinot Noir used a similar recipe as the one described above with the exceptions that 16.23 g of maize flour and 8.25 g of wheat germ was used, and that 30 g of freeze-dried deseeded powder of berries (Moreau, Benrey & Thiery 2006) obtained from the two grapevine varieties described above was added.

### **d) Survival and body size of larvae**

Survival of larvae was controlled every second day from hatching to the 5<sup>th</sup> larval instar. Body size of larvae was estimated by measuring the distance between the most distant lateral

sides of the head capsule margins called head capsule width (Delbac, Lecharpentier & Thiéry 2010), using a Nikon SMZ-10A stereoscopic microscope and VTO 232 video analysis system (Linkam Scientific Instruments). Head capsule (HC) width measurement is the most reliable measurement of body size in most Lepidoptera larvae (Godin, Maltais & Gaudet 2002; Panzavolta 2007; Delbac, Lecharpentier & Thiéry 2010).

#### **e) Collection of haemolymph and immune defenses**

Individual larvae were chilled on ice for 20 min, then a 3 µl sample of haemolymph was collected in a sterile glass capillary (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from a wound made in the posterior part of the ventral side of the abdomen. One µl of the haemolymph sample was transferred to a microcentrifuge tube containing 25 µl of cold sodium cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer (0.01M sodium cacodylate; 0.005M CaCl<sub>2</sub>; pH 6.5), and a 10 µl sample of this solution was immediately removed for haemocyte counting; the remainder was stored at –27°C for later measurement of the PO activity. The remaining haemolymph in the capillary (1 µl) was flushed into a microcentrifuge tube internally coated with n-phenylthiourea (Sigma P7629, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and containing 2 µl of cold sodium cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer. The tube was stored at –27°C for later assessment of antibacterial activity.

Concentration of haemocyte was measured using an improved Neubauer haemocytometer counting chamber under phase contrast microscopy (magnification 400 x). Activity of the PPO system was estimated through the measurement of the enzymatic activity of naturally activated PO enzymes (hereafter ‘PO activity’), and the activity of the proenzymes (PPO) together with that of PO (hereafter ‘total-PO activity’) using a spectrophotometric assay following the method described in Vogelweith et al. (2011). PO activity was quantified without further activation of the proenzyme, whereas total-PO activity required the conversion of the proenzyme into its active form with chymotrypsin. Each sample of haemolymph solution was thawed on ice and centrifuged (4000 × g, 15 min, 4°C). Five µl of the supernatant was added to a microplate well containing 20 µl of PBS and either 140 µl of distilled water, to measure PO activity only, or 140 µl of chymotrypsin solution (Sigma C-7762, 0.07 mg/ml of distilled water) to measure total-PO activity. A volume of 20 µl of L-dopa solution (Sigma D-9628; 4 mg/ml of distilled water) was then added to each well. The reaction was allowed to proceed for 40 min at 30°C in a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices). Readings were made every 15 s at 490 nm, and the data

were analyzed using SOFT-Max®Pro 4.0 software (Molecular Devices). Enzyme activity was measured as the slope (Vmax value: change in absorbance units/min) of the reaction curve during the linear phase of the reaction, and was reported as the activity of 1 µl of pure haemolymph.

Antimicrobial activity in the haemolymph was measured using the zone of inhibition assay described above (Vogelweith et al. 2011). Haemolymph samples were thawed on ice 2 µl of each haemolymph sample was placed in each well and the plates were incubated at 28°C for 48 h, at which time the diameters of inhibition zones were measured.

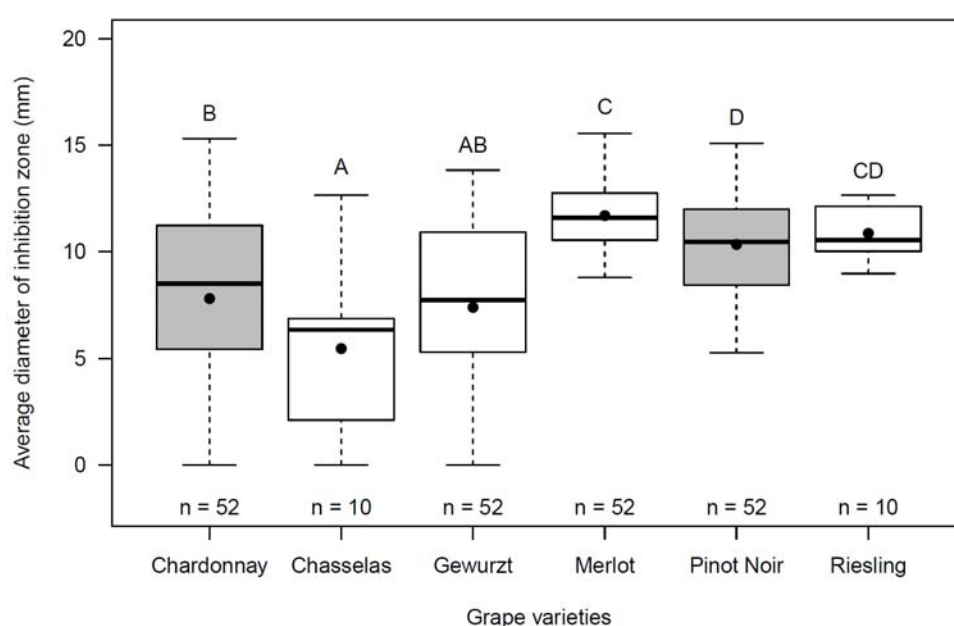
#### **f) Statistics**

Artificial diets without and with grape berries were analyzed separately since they differ in their basic recipe (see each recipe above). Effect of grape variety on berries antimicrobial activity was tested using the Kruskal-Wallis rank sum test because the data were not following the normal distribution. Following this test we used Tukey's HSD post-hoc test to assess the significance of grape variety. Larval survival across experimental diets was analysed using a Pearson's  $\chi^2$  test. We assessed the effect of experimental diets on haemocyte count by using the negative binomial generalized linear model (NBGLM); on PO and Total-PO activity, and on antimicrobial activity by using the Kruskal-Wallis rank sum test because the data were not following the normal distribution. Larval body size was normally distributed, and was assessed using analysis of variance (ANOVA). To investigate the relationship between the four immune parameters measured, we used Spearman's rank correlation coefficient with confidence interval of 95% (C.I.), because the data were not normally distributed. When the C.I. included 0, the correlation was not significant. Principal component analysis was used to summarize the information for the various immune parameters into one orthogonal principal component (the summary immune value) describing the basal level of immunity in larval haemolymph. Diet effect on synthetic value of immune system was assessed by Kruskal-Wallis rank sum test. For all comparisons the level of significance was set at  $\alpha = 0.05$ . All statistical tests were performed using the R (version 3.0.1) software.

### 3. RESULTS

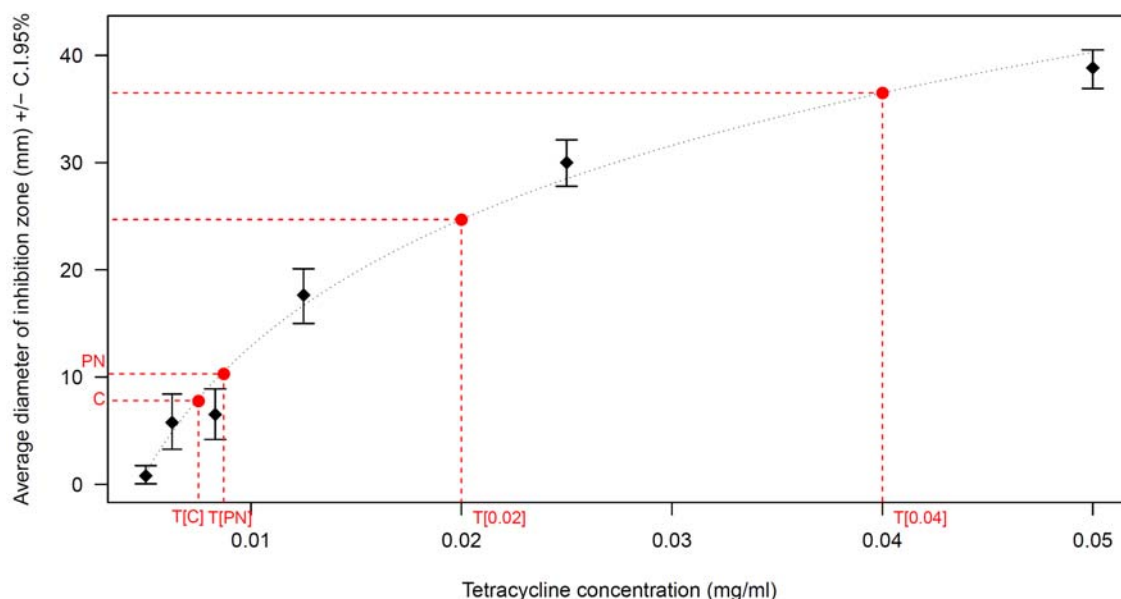
#### a) Antimicrobial activity of grape berries

Antimicrobial activity of berries was variable among grape varieties ( $\chi = 53.84$ ;  $P < 0.0001$ ; Fig. 1). Merlot berries had the higher antimicrobial activity and Chasselas the fewest. We can observe two groups of grape varieties. The first was composed of Chardonnay, Chasselas and Gewurztraminer with an average diameter of antimicrobial activity close to 7 mm. The second was composed of Merlot, Pinot Noir and Riesling with an average diameter of antimicrobial activity close to 11 mm (Fig. 1).



**Figure 1:** Average diameter of inhibition zone (mm) of grape varieties berries. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles, the central features are the medians, the dashed lines are the maxima and minima, and the black circles are the means. The same letter indicates the non significant difference ( $P > 0.05$ ). For each grape variety the number of larvae tested is shown below the x-axis.

Based on the serial dilution of tetracycline (Fig. 2), Chardonnay berries were found to have an equivalent concentration of  $7.53 \times 10^3$  mg/ml of tetracycline and those of Pinot Noir  $8.74 \times 10^3$  mg/ml.

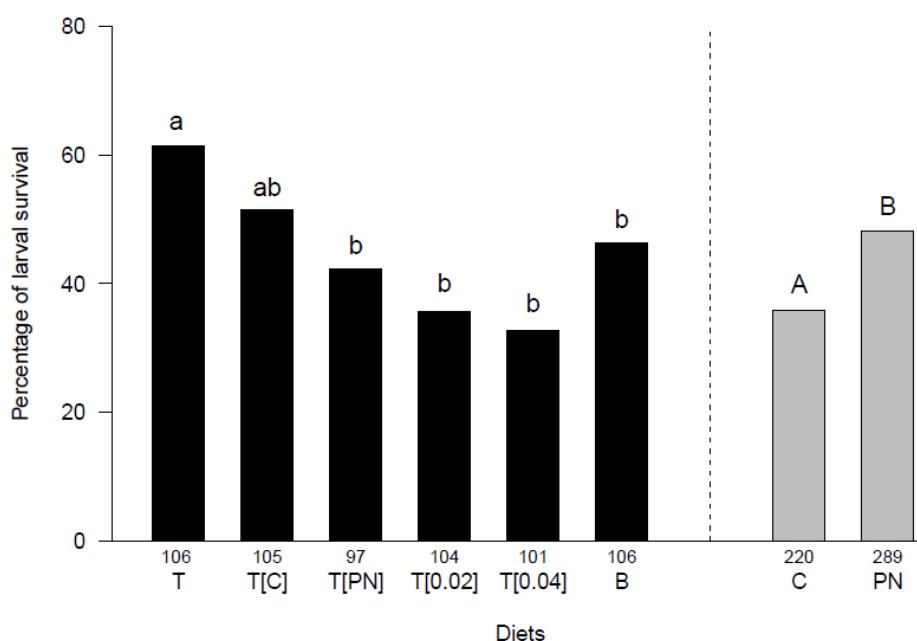


**Figure 2:** Average diameter of inhibition zone (mm) +/- C.I. of different concentration of tetracycline (mg/ml) (black diamond). The red circles represent the different concentration used in the experiment and the name of the associated diet. Dotted line represent the tendency curve ( $y = 1.7026 \ln(x) + 9.1031$ ). “C” is the average of antimicrobial activity of Chardonnay berries and T[C], its tetracycline equivalent. “PN” is the average of antimicrobial activity of Pinot Noir berries and T[PN], its tetracycline equivalent.

### b) *Survival and immune defenses of larvae across artificial diets*

Artificial diets without and with grape berries were analyzed separately since they differ in their basic recipe (see each recipe above).

Among diets made without, grape berries survival of larvae was significantly affected by the addition of tetracycline or the addition of bacteria (Table 1). The control diet (T) provided the best survival whereas the addition of tetracycline or bacteria increased mortality (Fig. 3). No survival differences were found between diets added with tetracycline and this added with bacteria (Fig. 3).



**Figure 3:** Percentage of larval survival from hatching to the 5<sup>th</sup> instar according to diets. Diets with the same lowercase letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). The number of larvae tested on each diet appears below the x-axis. See material and methods for acronyms.

**Table 1:** Effect of diets on larval survival, larval body size, haemocyte count, PO activity, total-PO activity, antimicrobial activity and synthetic value of immune system.  $P$  values  $\leq 0.05$  are shown in bold. <sup>a</sup>Pearson's  $\chi^2$  tests; <sup>b</sup>ANOVA; <sup>c</sup>NBGLM; <sup>d</sup>Kruskal-Wallis rank sum test.

|                                               | Artificial diets without berry |               | Artificial diets with berries |              |
|-----------------------------------------------|--------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------|
|                                               | Test value                     | p-value       | Test value                    | p-value      |
| Larval survival <sup>a</sup>                  | <b>24.30</b>                   | <b>0.0005</b> | <b>7.58</b>                   | <b>0.006</b> |
| Larval body size <sup>b</sup>                 | 1.03                           | 0.40          | 3.87                          | 0.06         |
| Concentration of haemocytes <sup>d,c</sup>    | 10.42                          | 0.10          | 0.31                          | 0.58         |
| PO activity <sup>d</sup>                      | 8.51                           | 0.20          | 0.55                          | 0.46         |
| Total-PO activity <sup>d</sup>                | 8.11                           | 0.23          | 0.81                          | 0.37         |
| Antimicrobial activity <sup>d</sup>           | 5.71                           | 0.46          | 8.87                          | <b>0.003</b> |
| Synthetic value of immune system <sup>d</sup> | 9.73                           | 0.14          | <b>4.72</b>                   | <b>0.03</b>  |

Artificial diets made of berries also affected survival of the larvae (Table 1). Survival was best in larvae reared on Pinot Noir diet than on Chardonnay one (Fig. 3).

Levels of specific and non-specific immune defenses in larvae were similar across artificial diets without berries (Table 1). Antimicrobial activity varied from 3.13 to 9.36 mm,

concentration of haemocytes from 9372 to 13608 haemocytes/ $\mu$ l, PO activity from 350 to 1941 miliunit/min and total-PO activity from 450 to 2202 miliunit/min.

For diets including berries, level of specific defense was higher in larvae reared on Chardonnay diet ( $7.91 \pm 1.71$  mm) than on Pinot Noir diet ( $2.91 \pm 0.78$  mm ; Table 1). Conversely, levels of non-specific defenses were similar in chardonnay and Pinot Noir diets (for haemocyte concentration: C:  $13773 \pm 1963$  haemocytes/ml; PN:  $14838 \pm 1055$  haemocytes/ml; for PO activity: C:  $720 \pm 223$  miliunit/min; PN:  $1345 \pm 446$  miliunit/min; for total-PO activity: C:  $1619 \pm 842$  miliunit/ml; PN:  $2482 \pm 904$  miliunit/min).

For both types of artificial diets (with and without berries), most of the immune defense components were correlated. Concentration of haemocytes, PO activity and total-PO activity were positively correlated and these parameters were all negatively correlated with antimicrobial activity (Table 2).

**Table 2:** Spearman rank correlation coefficients (p-value and C.I.) between four immune system parameters (Concentration of haemocytes, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) in the haemolymph of *E. ambiguella*. Values present above the grey diagonal are those for the diets without berry, and the values present below the grey diagonal are those for the diets with berries. Values in bold indicate significant correlations.

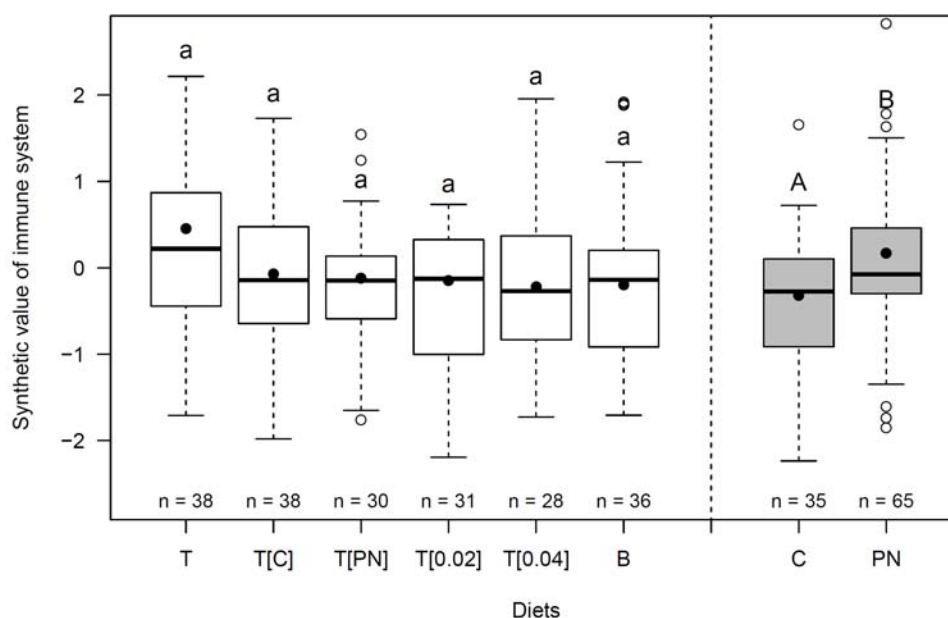
|                                | Concentration<br>of haemocytes         | PO activity                          | Total-PO<br>activity                 | Antimicrobial<br>activity               |
|--------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| Concentration<br>of haemocytes |                                        | <b>0.25; 0.0004</b><br>[0.10; 0.38]  | <b>0.35; 0.0001</b><br>[0.21; 0.47]  | <b>-0.24 ; 0.0005</b><br>[-0.37; -0.11] |
| PO activity                    | 0.07; 0.46<br>[-0.13; 0.27]            |                                      | <b>0.65; 0.0001</b><br>[0.53; 0.75]  | 0.07; 0.32<br>[-0.20; 0.07]             |
| Total-PO<br>activity           | <b>0.21; 0.03</b><br>[0.003; 0.40]     | <b>0.82 ; 0.0001</b><br>[0.69; 0.92] |                                      | <b>-0.28 ; 0.0001</b><br>[-0.40; -0.16] |
| Antimicrobial<br>activity      | <b>-0.28; 0.005</b><br>[-0.46 ; -0.08] | -0.09; 0.34<br>[-0.28; 0.10]         | <b>-0.27; 0.01</b><br>[-0.41; -0.06] |                                         |

The principal component analysis highlighted the trade-off between specific defense on the one hand (antimicrobial activity) and non-specific defenses on the other hand (concentration of haemocytes and activity of the system PO-PPO) (Table 3). The summary value of immune defenses did not vary across diets without berries but differed significantly

between diets with berries (Table 1; Fig. 4). Larvae reared on Chardonnay diet exhibited higher levels of specific and lower levels of non-specific defenses than larvae reared on Pinot Noir diet.

**Table 3:** Principal component analysis for four immune system parameters (haemocyte count, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) in the haemolymph of *E. ambiguella*. Component loadings describe the relationships between the first principal component (PC1) and the variables from which they were derived.

|                        | Artificial diets without<br>berry | Artificial diets with<br>berries |
|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Eigenvalue             | 1.37                              | 1.32                             |
| Explained variance (%) | 34.37                             | 33.04                            |
| Component loading      |                                   |                                  |
| Haemocyte count        | 0.63                              | 0.78                             |
| PO activity            | 0.45                              | 0.36                             |
| Total-PO activity      | 0.65                              | 0.48                             |
| Antimicrobial activity | -0.67                             | -0.72                            |



**Figure 4:** Synthetic value of immune system of 5<sup>th</sup> instar larvae according to diet on which larvae were reared. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles; the central features, the medians; and maxima and minima by dashed lines. Diets with the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). The number of larvae tested on each diet appears below the x-axis. See material and methods for acronyms.

## 4. DISCUSSION

Our study aims to investigate the effect of antibiotics, mimicking berries antimicrobial activity, on the adjustment between arms of the immune system of a phytophagous insect. The immune system of *E. ambiguella* was previously found to be influenced by grape varieties and partly mediated by existing physiological trade-offs between specific and non-specific immune defenses (Vogelweith et al. 2011). Such modulation of the immune system of *E. ambiguella* was hypothesized to result from two non-exclusive causes. First, adjustments between arms of the immune system of *E. ambiguella* could indirectly result from the presence of antibiotics, which differentially regulate the growth of microbes in the berries. Berries containing fewer antibiotics are also expected to contain more microbes, which should favor investment into specific antimicrobial immune defenses in the phytophagous insect. Conversely, berries with high concentration of antibiotics are expected to harbor few microbes, which should then allow to maintain non-specific defenses in the phytophagous insects. Second, berries from different grapes varieties are likely to differ in nutritional quality, composition of macronutrients is known to modulate investment between arms of the immune system of insects (Ponton et al. 2011; Ponton et al. 2013). This study focused mainly in the first above hypothesis, whereas we controlled for the potential additional effect of nutrition by using diets with berries.

Neither the use of different concentrations of tetracycline in the diet to mimic levels of antibiotic in berries nor the addition of bacteria mimicking high microbial contamination of the food affected the immune system of larvae of *E. ambiguella*. Conversely, the use of grape berries in the diet resulted in the modulation between specific and non-specific arms of the moth immune system. These results suggest that the presence of variable amount of antibiotics or bacteria in the diets does not explain the modulation of the immune system of the larvae we previously observed (Vogelweith et al. 2011). Our results even contrasted with those of Freitak et al. (2007), who found that microbial contamination of the food with *Escherichia coli* enhance antimicrobial defenses of the haemolymph at the expense of the PPO system. It is possible that *E. ambiguella* are less sensitive to microbial infection of the gut to induce such a modulation. Alternatively, as different microbes do not induce equivalent immune responses in insects (Lemaitre, Reichhart & Hoffmann 1997), it is still possible that the unknown bacteria growing and inoculated on the diet were not sufficiently immunogenic. From these results, the assumption that variation in the presence of antibiotic substances in

grape berries from different varieties explains variation in the modulation of the immune function of *E. ambiguella* is unlikely.

In contrast, as the immune defenses of *E. ambiguella* were modulated by the presence of berries extracts in the diet, such an effect on immune system of the larvae has to come from substances present in the berries other than antibiotics. Phenolic compounds are the most abundant secondary metabolites in plants (Conde et al. 2007). In grape berries, these compounds are mainly present in the skin, first part of the berry attacked by larvae, and in the seeds (Conde et al. 2007). The concentration of phenolic compounds in the berries depends strongly on the grape variety, but also on viticultural practices and environmental factors (Conde et al. 2007; Zhu et al. 2012). For instance, Zhu et al. (2012) have shown that the flavonols concentration was higher in Syrah, Cabernet Sauvignon and Merlot berries than in Gamay and Pinot Noir berries. Given these variations within a single compound (flavonols), it is expected that other berries compounds are also highly variable between the different grape varieties. In a recent study on *Manduca sexta*, del Campo et al. (2013) found larvae that fed on chlorogenic acid-supplemented diet (an ester of caffeic acid) have a higher number of circulating haemocytes and a better resistance to bacterial infection. Therefore, phenolic compounds affect insect immune system. Caffeic acid is involved in biosynthesis of phenolic compounds in grape berries (Conde et al. 2007). and is known to be effective antimicrobial agents (Almeida et al. 2006). Such phenolic compounds could explain the trade off previously obtained in larval immune defense.

In conclusion, variation in the presence of antibiotic substances in grape berries from different varieties does not explain variation in the modulation of the immune function of *E. ambiguella*. The immune defenses of *E. ambiguella* were modulated by the presence of berries extracts in the diet, such an effect on immune system of the larvae has to come from substances present in the berries. More investigation testing different berries compounds on larval immune parameters would be important to do to explain this trade-off.

## **Acknowledgments**

We thanks G. Wegner-Kiss for providing the initial moth strain, L. Delbac, A. Deschaseaux, M.-L. Felix and K. Muller for technical assistance. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006).

## References

- Almeida, A.A.P., Farah, A., Silva, D.A.M., Nunan, E.A. & Gloria, M.B.A. (2006) Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8738-8743.
- Armitage, S.A.O., Thompson, J.J.W., Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. (2003) Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 1038-1044.
- Ayres, J.S. & Schneider, D.S. (2009) The Role of Anorexia in Resistance and Tolerance to Infections in *Drosophila*. *Plos Biology*, 7.
- Babin, A., Biard, C. & Moret, Y. (2010) Dietary Supplementation with Carotenoids Improves Immunity without Increasing Its Cost in a Crustacean. *American Naturalist*, 176, 234-241.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 243-259.
- Boe, S.S. (2005) Investigation of bacteria associated with Australian wine grapes using cultural and molecular methods. University of New South Wales.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Sule, S. & Otten, L. (1998) Crown gall of grape - Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82, 1288-1297.
- Cerenius, L. & Soderhall, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 116-126.
- Chew, B.P. & Park, J.S. (2004) Carotenoid Action on the Immune Response. *The American Society for Nutritional Sciences*, 134, 2575-2615.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S. & Geros, H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.
- Cotter, S.C., Simpson, S.J., Raubenheimer, D. & Wilson, K. (2011) Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits. *Functional Ecology*, 25, 186-198.

- de Beer, A. & Vivier, M.A. (2008) Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *Bmc Plant Biology*, 8.
- del Campo, M.L., Halitschke, R., Short, S.M., Lazzaro, B.P. & Kessler, A. (2013) Dietary plant phenolic improves survival of bacterial infection in *Manduca sexta* caterpillars. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 146, 321-331.
- Delbac, L., Lecharpentier, P. & Thiéry, D. (2010) Larval instars determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Protection*, 29, 623-630.
- Feder, D., Mello, C.B., Garcia, E.S. & Azambuja, P. (1997) Immune responses in *Rhodnius prolixus*: Influence of nutrition and ecdysone. *Journal of Insect Physiology*, 43, 513-519.
- Fenton, A., Lamb, T. & Graham, A.L. (2008) Optimality analysis of Th1/Th2 immune responses during microparasite-macroparasite co-infection, with epidemiological feedbacks. *Parasitology*, 135, 841-853.
- Freitak, D., Wheat, C.W., Heckel, D.G. & Vogel, H. (2007) Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. *Bmc Biology*, 5.
- Godin, J., Maltais, P. & Gaudet, S. (2002) Head capsule width as an instar indicator for larvae of the cranberry fruitworm (Lepidoptera: Pyralidae) in southeastern New Brunswick. *Journal of Economic Entomology*, 95, 1308-1313.
- Graham, A.L. (2001) Use of an optimality model to solve the immunological puzzle of concomitant infection. *Parasitology*, 122, S61-S64.
- Imler, J.L. & Bulet, P. (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chemical Immunology and Allergy*, 86, 1-21.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1997) *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14614-14619.
- Moreau, J., Benrey, B. & Thiery, D. (2006) Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? *Functional Ecology*, 20, 592-600.

- Moret, Y. (2003) Explaining variable costs of the immune response: selection for specific versus non-specific immunity and facultative life history change. *Oikos*, 102, 213-216.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2009) Immune responses of bumblebee workers as a function of individual and colony age: senescence versus plastic adjustment of the immune function. *Oikos*, 118, 371-378.
- Panzavolta, T. (2007) Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. *Environmental Entomology*, 36, 1054-1058.
- Ponton, F., Wilson, K., Cotter, S.C., Raubenheimer, D. & Simpson, S.J. (2011) Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *Plos Pathogens*, 7.
- Ponton, F., Wilson, K., Holmes, A.J., Cotter, S.C., Raubenheimer, D. & Simpson, S.J. (2013) Integrating nutrition and immunology: A new frontier. *Journal of Insect Physiology*, 59, 130-137.
- Povey, S., Cotter, S.C., Simpson, S.J., Lee, K.P. & Wilson, K. (2009) Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? *Journal of Animal Ecology*, 78, 437-446.
- Renouf, V., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. (2005) Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 316-327.
- Siva-Jothy, M.T. & Thompson, J.J.W. (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology*, 27, 206-212.
- Thiery, D. & Moreau, J. (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, 143, 548-557.
- Visser, M. (2011) An evaluation of the efficacy of antimicrobial peptides against grapevine pathogens. University of Stellenbosch.
- Vogelweith, F., Thiery, D., Quaglietti, B., Moret, Y. & Moreau, J. (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology*, 25, 1241-1247.
- Zhu, L., Zhang, Y.L., Deng, J.J., Li, H.R. & Lu, J. (2012) Phenolic Concentrations and Antioxidant Properties of Wines Made from North American Grapes Grown in China. *Molecules*, 17, 3304-3323.

## ANNEXE 4

# GEOGRAPHICAL VARIATION IN PARASITE PREVALENCE SHAPES LARVAL IMMUNITY IN A PHYTOPHAGOUS INSECT

VOGELWEITH, F.<sup>1</sup>, DOURNEAU, M.<sup>1</sup>, THIERY, D.<sup>2</sup>, MORET, Y.<sup>1</sup> & MOREAU, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup>INRA UMR 1065 Save, Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France

Key-words: grape varieties, immune defence, *Lobesia botrana*, successful parasitism, tritrophic interactions.

*Accepté par Naturwissenschaften*

## 1. INTRODUCTION

By altering the growth, fecundity and survival of their hosts, parasites and pathogens represent strong selective forces. Numerous lines of defence have evolved in response to such selective pressures, amongst which the immune system is probably the most sophisticated (Zuk & Stoehr 2002), with efficient immune systems clearly important in counteracting the potentially negative effects of parasites. However, despite this obvious benefit, much variation is typically evident within and among populations with respect to susceptibility to parasites. This suggests that variable selection pressures may shape and drive adaptation of immune traits. For instance, the ability of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, to encapsulate parasitoid eggs or resist fungal infection has been found to be geographically variable (Kraaijeveld & Vanalphen 1995; Tinsley, Blanford & Jiggins 2006), suggesting that the immune system may have adapted to local conditions, such as parasite abundance or virulence (Kalbe & Kurtz 2006; Cornet, Biard & Moret 2009).

Although there have been numerous studies in ecological immunology, few have investigated variations in immune defence among natural populations, and consequently there is inadequate information about the spatial variability of immune defences in the wild. Life history theory states that immunity is costly and imposes resource-based trade-offs with other fitness traits (Sheldon & Verhulst 1996). Three lines of evidence suggest that these trade-offs are a potential source of variation in investment in immune systems. First, when expressed at

high levels, immunity is often traded off against other fitness parameters (Kraaijeveld & Godfray 1997). Second, mounting an immune response can impose condition-dependent fitness costs (Ilmonen, Taarna & Hasselquist 2000; Moret & Schmid-Hempel 2000). Third, producing an immune response often involves the release of cytotoxic chemicals that are harmful to the host (Nappi & Ottaviani 2000; Sadd & Siva-Jothy 2006). Hence, natural variation in immune function is expected to be the unavoidable consequence of balancing the relative benefits and costs of immunity.

Variation in immune defence can also result from environmental conditions, which may affect the expression of the immune response and, consequently, the outcome of host infection. Nutrition is becoming recognized as a critical factor in immune defence and resistance to pathogens (Lazzaro & Little 2009; Ponton et al. 2011). Experimental studies of insects have demonstrated that food deprivation in the host leads to reduced immune responsiveness (Siva-Jothy & Thompson 2002; Ayres & Schneider 2009), and changes in the expression of several immunity genes (Pletcher et al. 2002). Resistance to parasite infection can also be affected by changes in food composition (Povey et al. 2009; Cotter et al. 2011). In addition to host resistance to infection, nutrition can also affect tolerance, which is a defence process by which the negative impact of infection on host fitness is reduced without reducing the parasite load (Ayres & Schneider 2012; Medzhitov, Schneider & Soares 2012). For instance, food-restricted *Drosophila* infected with *Salmonella* showed similar levels of bacteria to infected control *Drosophila*, but survived longer, suggesting that resistance was unchanged but tolerance was increased (Ayres & Schneider 2009). Hence, nutrition and food composition may be key parameters having a reversible impact on immunity. In the long term, they could also influence the evolution of the physiology of the host, with potential consequences for the immune system.

Tritrophic systems involving insect herbivores and their host plants and natural enemies provide a useful model for addressing immunoecological issues, especially with regard to the potential combined effects of parasitism and nutrition on the evolution of host immune defences in natural populations. Indeed, the relative performance of phytophagous insects is classically constrained by selective forces imposed by both their host plants and natural enemies, imposing bottom-up and top-down selection pressures, respectively (Hairston, Smith & Slobodkin 1960). Through their relative composition of nutrients and toxic defensive compounds, host plants affect the condition of phytophagous insects (Coley, Bateman & Kursar 2006; Smilanich et al. 2009), with major consequences for the expression of immune

defence systems (Klemola et al. 2007; Bukovinszky et al. 2009; Vogelweith et al. 2011). Hence, host plants have the potential to influence either directly or indirectly the evolving physiology of the immune system of phytophagous insects. However, parasitoids are major sources of mortality among natural populations of insect herbivores (Hawkins, Cornell & Hochberg 1997; Smilanich et al. 2009). The strong selective pressure exerted by parasitoids could well lead to higher levels of immune system investment by their hosts. In contrast, because of the costs associated with immune defence (Schmid-Hempel 2003; Siva-Jothy, Moret & Rolff 2005), when parasitoid selective pressure is relaxed, investment in immunity is likely to be selected against.

In this study we investigated variations in immunity in natural populations of a phytophagous insect, as a result of selective pressures imposed by variation amongst host plants, and by parasitism. The study involved one of the main tortricid pests in European vineyards, the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. The larvae of *L. botrana* are polyphagous, and in vineyards can develop on most grape varieties present despite their different nutritional values (Moreau, Benrey & Thiery 2006b; Moreau, Benrey & Thiery 2006a). To investigate the effects of geographical area and parasite prevalence on insect immunity the larvae for our study were collected from several grape varieties in a number of vineyards in different regions of France.

As in other insects, immune defence relies on constitutive mechanisms involving cellular and humoral components (Hoffmann, Reichhart & Hetru 1996; Siva-Jothy, Moret & Rolff 2005). For example, haemocytes are immune cells that circulate in the haemolymph and are recruited in processes such as phagocytosis and the encapsulation of parasites, including parasitoid eggs. This latter process often involves melanization of the foreign object through activation of the prophenoloxidase (PPO) cascade, which is a common and generalized response to invasion by a parasite (Cerenius & Soderhall 2004). Coupled with this line of defence is the induced response, which consists mainly of a suite of antimicrobial peptides (Iwanaga & Lee 2005) that are usually produced within 3 h following a microbial infection; the resulting antibacterial activity conferred on the haemolymph can last for several days (Haine et al. 2008).

We measured the baseline levels of a broad range of constitutive (haemocyte count, PPO system activity) and inducible (antimicrobial activity) immune defences among wild larvae collected in different vineyards. To assess potential trade-offs between immune defence and other fitness-related traits, we measured the size of the larvae at the end of their development.

We also measured the prevalence of infection of the larvae by local parasitoids to estimate the relative selective pressure they imposed locally (Moreau et al. 2010). We used this approach to enable estimation of potential geographical covariations (such as temperature) between parasitoid infection prevalence, immune defences and other phenotypic traits among populations of *L. botrana*. If host plant variety markedly affects the expression of immune defences in *L. botrana*, we hypothesized that the above covariations would be influenced by the grape varieties from which larvae were sampled.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

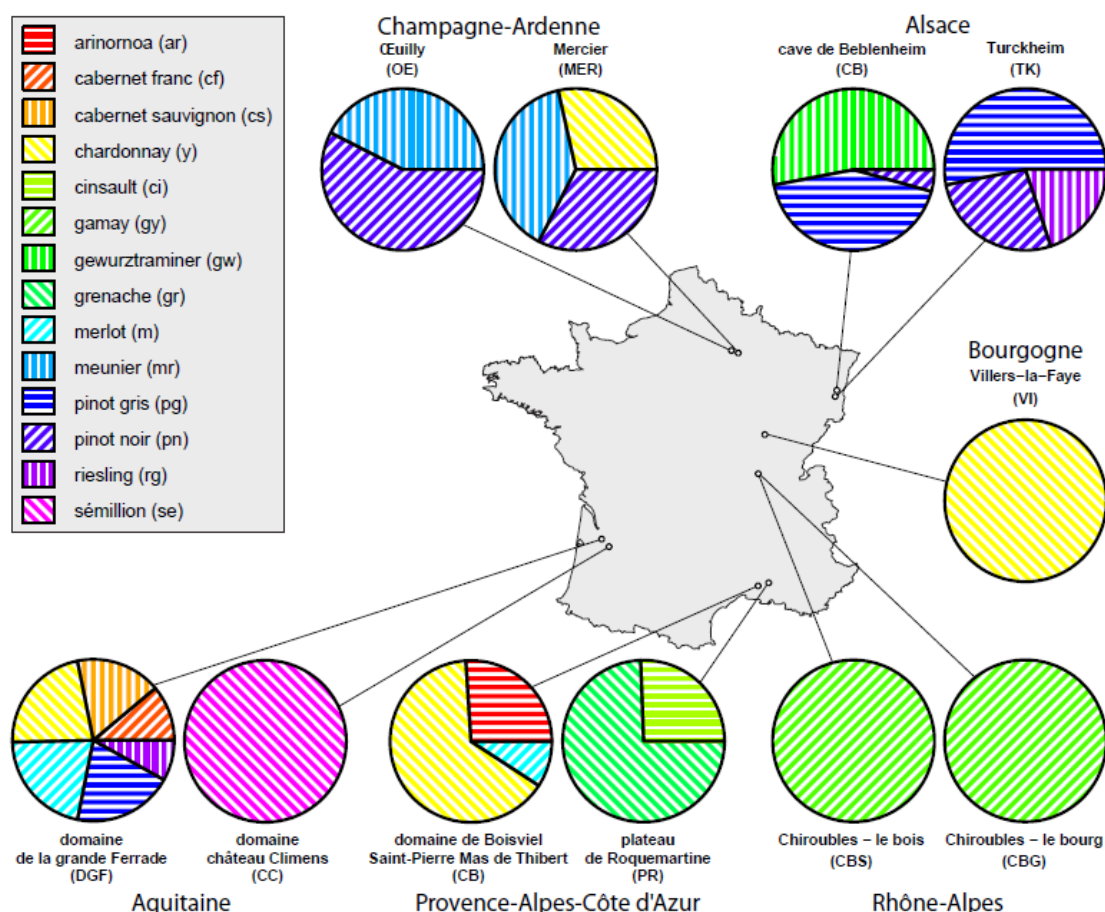
This work conforms to French legal requirements, and to accepted international ethical standards, including those relating to conservation and welfare, and to the journal's policy on these matters. All experiments have been conducted in conformity with the Guiding principles in the care and use of animals' approved by the Council of the American Physiological Society.

### **(a) Model insect, the host species**

*L. botrana* (Lepidoptera, Tortricidae) is one of the major grape pests in Europe because of its wide geographical distribution and the damage it can cause to bunches (Thiéry 2008). Depending on the region, in Europe *L. botrana* completes 2–4 broods each year. The first generation of eggs is laid on the flower buds, and on hatching the young larvae form and aggregate in protective silk shelters termed glomerulae, and eat the buds. The second generation emerges at the end of June–July, and the third generation occurs between mid-August and the end of September. The larvae are polyphagous, and can develop on almost any grape variety and other plant species (Thiéry 2005; Moreau, Benrey & Thiery 2006a; Thiéry 2008). Each generation can cause serious damage to grape bunches; the damage can be quantitative and/or qualitative, and can facilitate infection by pathogenic fungi including the grey mold *Botrytis cinerea* (Leotiales, Sclerotiniaceae) (Roehrich and Boller 1991) and black mold *Aspergillus* spp. (Thiéry 2008). Because of this, economic losses resulting from larval feeding on berries, and infection by fungi related to larval feeding, are typically attributed to the grapevine moth (Thiéry 2008).

## (b) Vineyard larval sampling

Six viticultural regions of France were sampled in May and June 2011 (corresponding to the end of the first moth generation): Alsace, Aquitaine, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Rhône-Alpes and Provence-Alpes-Côte d'Azur (Fig. 1). In each region, one or two vineyards were sampled: Cave de Beblenheim (CB) and Turckheim (Tscharntke and Hawkins) in Alsace, Château Climens (CC) and Domaine INRA de la Grande Ferrade (DGF) in Aquitaine, Villiers (VI) in Bourgogne, Oeuilly (OE) and Mercier (MER) in Champagne-Ardenne, Domaine de Boisviél (DB) and Plateau de Roquemartine (PR) in Rhône-Alpes and Chiroubles-le Bourg (CBG) and Chiroubles-le Bois (CBS) in Provence-Alpes-Côte d'Azur. In each vineyard we sampled 1–5 grape varieties (Fig. 1).



**Figure 1:** Map of the locations of the French vineyards sampled in the study. The coloured hatching represents the various grape varieties sampled. The pie charts represent the proportion of *L. botrana* larvae sampled on the various grape varieties.

For each variety larvae were only collected when population monitoring indicated that there were > 20 larvae per 100 bunches. Using this procedure we were able to measure the direct

effect of grape variety while avoiding the potential confounding effects of environmental variation (including temperature, light exposure and humidity) among vineyards. We sampled larvae at the end of larval development (5<sup>th</sup> instar stage) from the first generation on young flower buds. Larvae of *L. botrana* rarely move from one bunch to another, and consequently each larva was assumed to have completed its development on the bunch from which it was collected (Torres-Vila, Stockel & Rodriguez-Molina 1997). The collection process was non destructive; only the silk nests containing the larvae were removed from each bunch. The grape pest used in this study is Tortricids belonging to the Olethreutinae family in which females lay separate eggs. Typically *L. botrana* exhibit spacing oviposition behaviour (Thiery & Gabel 1993; Gabel & Thiery 1996). As a result larvae are not gregarious and larvae are single per nest. Until used in experiments, the larvae were maintained in polyethylene boxes (60 x 40 x 21.4 cm) at  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  RH and under the ambient photoperiod conditions; they were fed ad libitum on grape bunches from the collection locality. For experiments the larvae were randomly separated into two samples. One was used to measure successful parasitism (number of parasitoids emerged). This involved checking larvae daily until pupation, at which time the pupae were carefully removed from the flower buds and placed individually in glass tubes (70 × 9 mm diameter) closed with cotton plugs, and stored at  $23^{\circ}\text{C}$  under ambient photoperiod conditions. The pupae were monitored daily for adult emergence. Parasitism was measured *a posteriori* by checking adult emergence and for each grape variety the successful parasitism was calculated as:  $[\text{number of parasitoids}/(\text{number of } L. \textit{botrana} + \text{number of parasitoids emerged})] \times 100$ . The second subsample was used to measure four key immune system parameters in each individual following haemolymph collection: haemocyte count, PO activity and total-PO activity, and antimicrobial activity (see below). For each measurement, the number of individuals tested is indicated on the figures, below the x-axis. To test the effect of temperature on the larval immune system we recorded the mean daily temperature over a set period of 12 days during the two months prior to larval sampling (March and April), and calculated the average of these temperatures for each vineyard. March is the period of adult flight and April the period of egg laying. The temperatures were obtained from the website <http://weatherspark.com/>.

### **(c) Haemolymph collection**

Individual larvae from the second subsample were chilled on ice for 20 min, then a 2  $\mu\text{l}$  sample of haemolymph was collected in a sterile glass capillary (Hirschmann Laborgeräte,

Eberstadt, Germany) from a wound made in the posterior part of the ventral side of the abdomen. One  $\mu\text{l}$  of the haemolymph sample was transferred to a microcentrifuge tube containing 25  $\mu\text{l}$  of cold sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer (0.01M sodium cacodylate; 0.005M  $\text{CaCl}_2$ ; pH 6.5), and a 10  $\mu\text{l}$  sample of this solution was immediately removed for haemocyte counting; the remainder was stored at  $-27^\circ\text{C}$  for later measurement of the PO activity. The remaining haemolymph in the capillary (1  $\mu\text{l}$ ) was flushed into a microcentrifuge tube internally coated with n-phenylthiourea (Sigma P7629, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and containing 2  $\mu\text{l}$  of cold sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer. The tube was stored at  $-27^\circ\text{C}$  for later assessment of antibacterial activity.

#### **(d) Immune parameters**

Haemocyte counts were undertaken using an improved Neubauer haemocytometer counting chamber and phase contrast microscopy (magnification 400 $\times$ ). The activity of naturally activated PO enzymes (hereafter 'PO activity'), and the activity of the PPO proenzymes in addition to that of PO (hereafter 'total-PO activity') were measured using a spectrophotometer following the method described by Cornet et al. (2009). PO activity was quantified without further activation, while total-PO activity required conversion of the PPO to PO with chymotrypsin. For each sample the frozen haemolymph was thawed on ice and centrifuged (4000  $\times$  g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ). A sample of the supernatant (5  $\mu\text{l}$ ) was added to a microplate well containing 20  $\mu\text{l}$  of PBS and either 140  $\mu\text{l}$  of distilled water, to measure PO activity only, or 140  $\mu\text{l}$  of chymotrypsin solution (Sigma C-7762, 0.07 mg/ml of distilled water) to measure total-PO activity. A volume of 20  $\mu\text{l}$  of L-dopa solution (Sigma D-9628; 4 mg/ml of distilled water) was then added to each well. The reaction was allowed to proceed for 40 min at  $30^\circ\text{C}$  in a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices). Readings were made every 15 s at 490 nm, and the data were analyzed using SOFT-Max®Pro 4.0 software (Molecular Devices). Enzyme activity was measured as the slope ( $V_{\text{max}}$  value: change in absorbance units/min) of the reaction curve during the linear phase of the reaction, and was reported as the activity of 1  $\mu\text{l}$  of pure haemolymph.

Antimicrobial activity in the haemolymph was measured using a standard zone of inhibition assay (Moret 2006). The samples were thawed on ice, and using the assay described below, were tested for antimicrobial activity, based on the formation of zones of inhibition in agar plates seeded with the bacterium *Arthrobacter globiformis*. A single colony of *A. globiformis* from a streak plate was inoculated into a broth medium (10 g bacto-tryptone, 5 g

yeast extract and 10 g NaCl in 1000 ml of distilled water, pH 7.0) and incubated overnight at 30°C. From this culture the bacterium was inoculated into a broth medium containing 1% agar to achieve a final density of  $10^5$  cells ml<sup>-1</sup>. This inoculated agar medium (6 ml) was poured into a Petri dish and allowed to solidify. Wells for sample addition were made in the agar using a Pasteur pipette fitted with a ball pump. For each thawed test sample solution, 2 µl was added to a well in the agar plate. A positive control (tetracycline: Sigma T3383) was included in each plate. The plates were incubated for 48 h at 30°C, at which time the diameters of inhibition zones were measured.

#### **(e) Larval body size and parasitism**

The body size of *L. botrana* is correlated to immunocompetence (Vogelweith *et al.* 2013). We estimated larval body size by measuring the distance between the most distant lateral sides of the head capsule margins (Delbac, Lecharpentier & Thiéry 2010) using a Nikon SMZ-10A stereoscopic microscope and a VTO 232 video analysis system (Linkam Scientific Instruments). Several larval body size and instar indicators may be used. Head capsule (HC) width measurement is the most reliable measurement of body size in most Lepidoptera larvae (Godin, Maltais & Gaudet 2002; Panzavolta 2007; Delbac, Lecharpentier & Thiéry 2010) and was thus used for this study. Alternative sizing or weighting of living old larvae is extremely difficult in *L. botrana* which move vigorously and are thus tricky to handle. In a recent study Delbac *et al.* (2010) developed a simple and convenient statistical model based on HC size in order to determine the larval instars of field individuals. Interestingly HC size varies among individuals within instar. Fourth and fifth instars were the easiest to discriminate because of non overlapping distributions. Thus we selected this parameter.

Because parasitoid feeding injuries or the presence of parasitoid eggs can challenge the immune system of larvae (Barnes & Siva-Jothy 2000), only non parasitized larvae, or larvae with no evidence of parasitoid feeding injuries, were used in the measurement of immune parameters. To assess the status of larvae, each larva was carefully inspected using a binocular microscope (see characteristics above). After the immune collection, all larvae were dissected to control for possible effects of parasitoid eggs in the hemolymph on immune levels of larvae. Those larvae having visible infections (the presence of feeding injuries, parasitoid eggs or encapsulated parasitoid eggs) were excluded from the analysis.

### **(g) Statistical analysis**

The grape varieties in each vineyard differed among the viticultural areas in the study. Therefore, we were unable to use nested analyses or generalized linear models with interaction terms between vineyards and grape varieties. Consequently, analysis of the immune system and parasitism success required two steps. In the first step we assessed differences in the larval immune system and successful parasitism among grape varieties in each vineyard. To test the effect of grape variety on haemocyte counts, PO activity and total-PO activity we used negative binomial generalized linear model (NBGLM), because the data follow the negative binomial distribution. To assess the parasitism rate we used Pearson's  $\chi^2$  test, and as the antimicrobial activity showed a binary distribution we assessed differences in this parameter using Pearson's  $\chi^2$  test. Body size was normally distributed, and was assessed using analysis of variance (ANOVA). Vineyards having only a single grape variety were not included in the analysis. In the second step, to test for the effect of vineyard we chose vineyards having a common grape variety, and used the negative binomial generalized linear model (NBGLM) for comparison of haemocyte counts, the Kruskal-Wallis rank sum test for comparison of PO activity and total-PO activity, and Pearson's  $\chi^2$  tests for comparison of antimicrobial activities and successful parasitism. None of the data were normally distributed. For analysis of body size we used analysis of variance (ANOVA) because the data were normally distributed. Following these tests we used Tukey's HSD post-hoc test to assess the significance of grape variety or vineyard. To investigate the relationship between the four immune parameters measured within a single population we used Spearman's rank correlation coefficient with a confidence interval of 95% (C.I.), because the data were not normally distributed. When the C.I. included 0, the correlation was not significant. Principal component analysis was used to summarize the information for the various immune parameters into one orthogonal principal component (the summary immune value) describing the basal level of immunity in larval haemolymph. The relationships between PC1 and successful parasitism, PC1 and head capsule size, and PC1 and temperature were explored using Spearman's rank correlation coefficient with a confidence interval of 95% (C.I.) between the different grape varieties. To check the results of these correlations, we have run a second analysis by taking into account only the vineyards. To this purpose, we calculated average levels of PC1, successful parasitism, and head capsule size per vineyard as the sum of these variables for each cultivar within vineyards divided by the number of cultivars within each vineyard. The temperature data were analyzed separately because of the confounding effect with the North-South

gradient vineyards. Due to the controversy of adjustment following multiple comparisons tests (Moran 2003; Nakagawa 2004), no correction was made after multiple comparisons. However, the outcome of these multiple comparisons was examined by calculating the probability of having exactly one test being statistically significant due to chance alone, using a Bernoulli process (Moran 2003). For all comparisons the level of significance was set at  $\alpha = 0.05$ . All statistical tests were performed using the R (version 3.0.1) software.

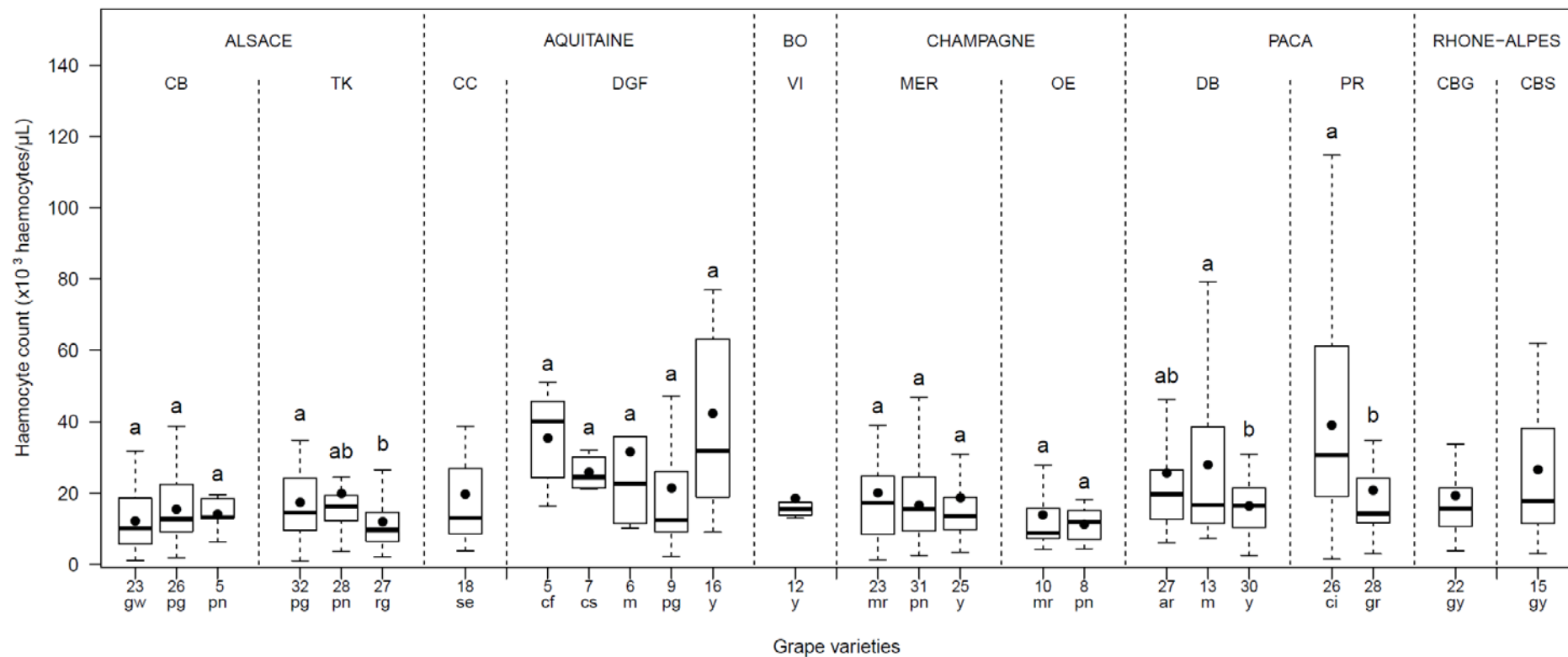
### **3. RESULTS**

#### **Effect of grape variety on immune parameters, successful parasitism and larval size within a vineyard**

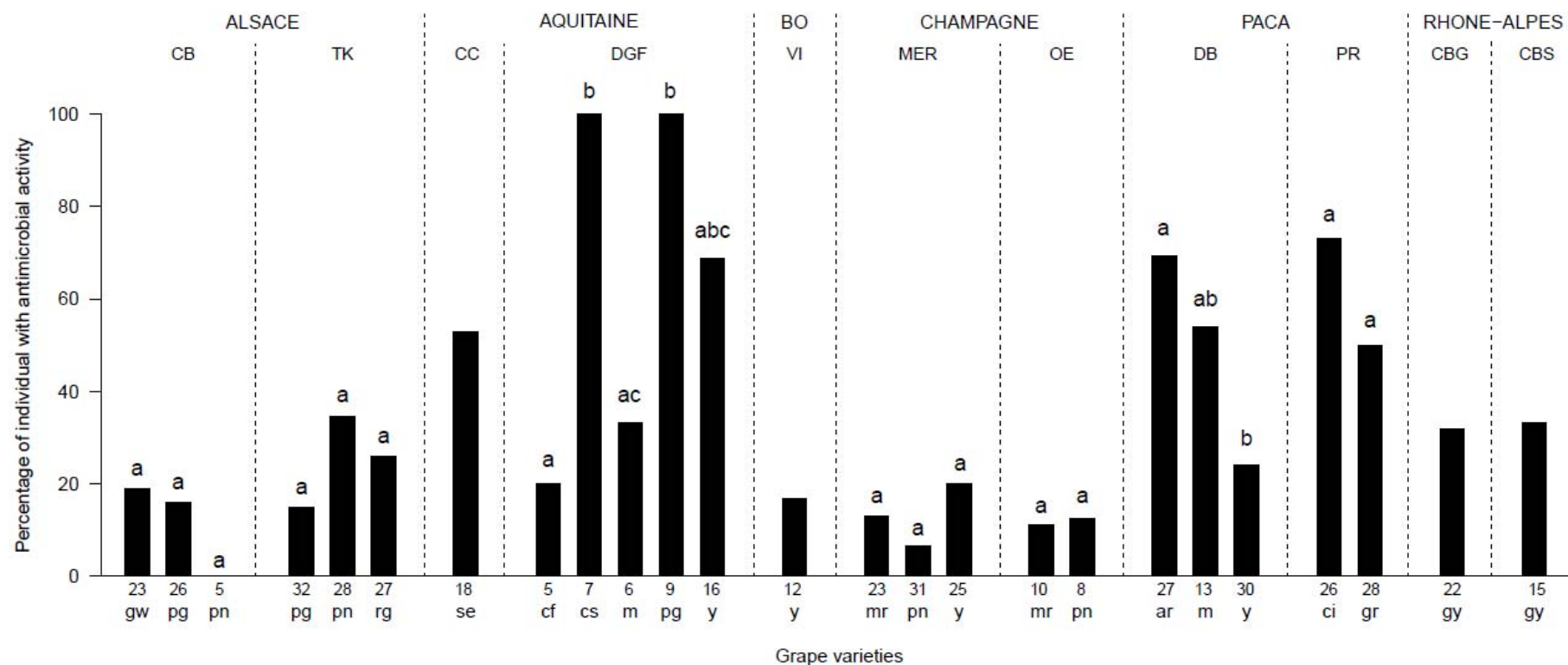
No effect of grape variety on PO activity or total-PO activity was detected in the haemolymph of larvae from within each vineyard (Table 1). However, the larval haemocyte count was dependent of the grape variety in three vineyards (Domaine de Boisviel, Plateau de Roquemartine and Turckheim), with those from the Merlot, Cinsault and Pinot Gris varieties having higher haemocyte counts than those collected on the Chardonnay, Grenache and Riesling varieties (Table 1, Fig. 2). For the vineyards Domaine de la Grande Ferrade and Domaine de Boisviel, grape variety also affected the percentage of larvae having antimicrobial activity (Table 1, Fig. 3). For instance, for Domaine de Boisviel, 69% of the larvae sampled from the Arinornoa variety had antimicrobial activity, while only 24% of those sampled from the Chardonnay variety had this activity. The successful parasitism was also dependent on the grape variety in these two vineyards (Table 1, Fig. 4). For example, for Domaine de la Grande Ferrade the larvae collected on the Merlot variety were significantly more parasitized than those collected on the Cabernet Sauvignon and Chardonnay varieties (Fig. 4). For Domaine de Boisviel the larvae collected on the Arinornoa and Merlot varieties were more heavily parasitized than those collected on the Chardonnay variety (Fig. 4). The body size of larvae was affected by grape variety at only one vineyard (Domaine de Boisviel; Table 1), with those collected on the Chardonnay variety being larger ( $0.99 \pm 0.04$  mm) than those from the Arinornoa variety ( $0.96 \pm 0.07$  mm).

**Table 1:** Effect of grape variety in each vineyard on haemocyte count, PO activity, total-PO activity, antimicrobial activity, successful parasitism and larval body size. *P* values  $\leq 0.05$  are shown in bold. <sup>a</sup>NBGLM; <sup>b</sup>Pearson's  $\chi^2$  tests; <sup>c</sup>ANOVA. See Figure 1 for definitions of the acronyms. The outcome of these multiple statistical tests was validated by the probability *p* (*p* = 0.002) calculation of having *k* (*k* = 8) significant tests over *N* (*N* = 49) performed tests following  $p = [N!/(N-K)!K!] \times \alpha^K(1-\alpha)^{N-K}$  (Moran 2003).

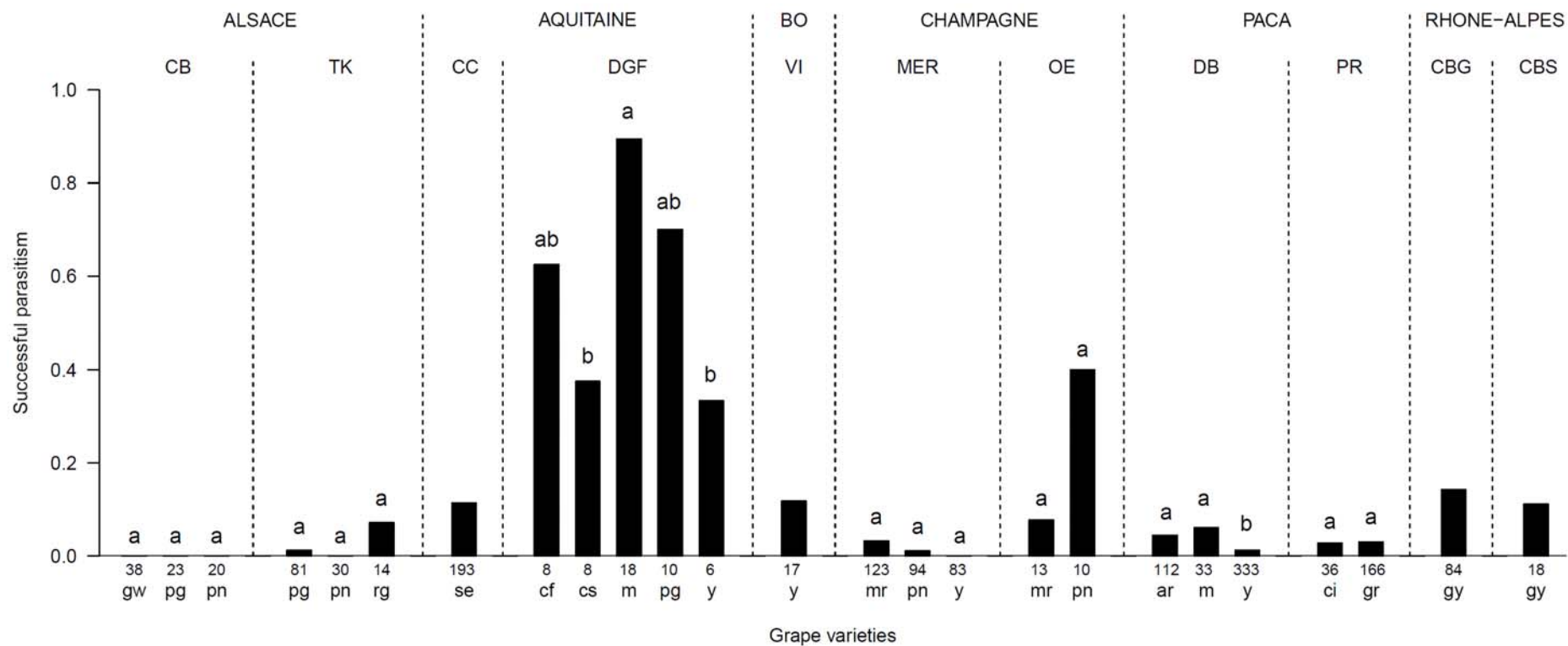
| Vineyards <sub>df</sub> | Haemocyte count <sup>a</sup> |              | PO activity <sup>a</sup> |          | Total-PO activity <sup>a</sup> |          | Antimicrobial activity <sup>b</sup> |               | Parasitism success <sup>b</sup> |             | Body size <sup>c</sup> |             |
|-------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------|----------|--------------------------------|----------|-------------------------------------|---------------|---------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
|                         | $\chi$                       | <i>P</i>     | $\chi$                   | <i>P</i> | <i>X</i>                       | <i>P</i> | $\chi^2$                            | <i>P</i>      | $\chi^2$                        | <i>P</i>    | <i>F</i>               | <i>P</i>    |
| CB <sub>2</sub>         | 1.70                         | 0.42         | 2.44                     | 0.29     | 2.65                           | 0.26     | 1.88                                | 0.39          | 0                               | 0           | 2.97                   | 0.06        |
| TK <sub>2</sub>         | <b>8.32</b>                  | <b>0.01</b>  | 4.70                     | 0.09     | 4.59                           | 0.10     | 2.88                                | 0.23          | 3.29                            | 0.19        | 2.52                   | 0.08        |
| CC <sub>0</sub>         | -                            | -            | -                        | -        | -                              | -        | -                                   | -             | -                               | -           | -                      | -           |
| DGF <sub>4</sub>        | 6.32                         | 0.18         | 0.57                     | 0.96     | 0.71                           | 0.95     | <b>20.86</b>                        | <b>0.0003</b> | <b>10.06</b>                    | <b>0.04</b> | 0.05                   | 0.99        |
| VI <sub>0</sub>         | -                            | -            | -                        | -        | -                              | -        | -                                   | -             | -                               | -           | -                      | -           |
| MER <sub>2</sub>        | 0.98                         | 0.61         | 0.78                     | 0.67     | 0.99                           | 0.60     | 2.35                                | 0.31          | 3.50                            | 0.17        | 0.04                   | 0.96        |
| OE <sub>1</sub>         | 0.55                         | 0.45         | 0.67                     | 0.41     | 0.24                           | 0.62     | 0.008                               | 0.92          | 3.47                            | 0.06        | 0.06                   | 0.81        |
| DB <sub>2</sub>         | <b>8.64</b>                  | <b>0.01</b>  | 0.01                     | 0.99     | 0.68                           | 0.71     | <b>11.94</b>                        | <b>0.003</b>  | <b>6.19</b>                     | <b>0.04</b> | <b>3.63</b>            | <b>0.03</b> |
| PR <sub>1</sub>         | <b>8.72</b>                  | <b>0.003</b> | 2.10                     | 0.14     | 0.34                           | 0.25     | 3.06                                | 0.08          | 0.006                           | 0.94        | 0.68                   | 0.41        |
| CBG <sub>0</sub>        | -                            | -            | -                        | -        | -                              | -        | -                                   | -             | -                               | -           | -                      | -           |
| CBS <sub>0</sub>        | -                            | -            | -                        | -        | -                              | -        | -                                   | -             | -                               | -           | -                      | -           |



**Figure 2:** Haemocyte count ( $\times 10^3$  haemocytes  $\mu\text{L}^{-1}$ ) in the haemolymph of larvae from various grape varieties in different vineyards. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles, the central features are the medians, the dashed lines are the maxima and minima, and the black circles are the means. Within a vineyard, grape varieties having the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). For each grape variety the number of larvae tested is shown below the x-axis. See Figure 1 for definitions of the acronyms



**Figure 3:** Percentage of larvae having haemolymph antimicrobial activity among grape varieties from different vineyards. Within a vineyard, grape varieties having the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). For each grape variety the number of larvae tested is shown below the x-axis. See Figure 1 for definitions of the acronyms.



**Figure 4:** Parasitism of larvae among grape varieties from different vineyards. Within a vineyard, grape varieties with the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ). For each grape variety the number of larvae tested is shown below the x-axis. See Figure 1 for definitions of the acronyms.

### **Larval immune parameters, successful parasitism and larval size on the same grape variety among vineyards**

The Chardonnay, Gamay, Meunier, Pinot Noir and Pinot Gris varieties were selected to assess the effect of vineyard. The haemocyte count and PO activity of larvae collected from the Chardonnay variety depended on the vineyard from which they were collected (Table 2). For instance, the larvae collected from Domaine de Boisviel had higher haemocyte counts and PO activity than larvae collected from other vineyards. The vineyard of collection also affected the total-PO and antimicrobial activity associated with larvae collected on the Chardonnay, Pinot Noir and Pinot Gris varieties (Table 2). The rate of parasitism of larvae from the Pinot Gris, Pinot Noir and Chardonnay varieties depended on the vineyard (Table 2), with those collected from the Pinot Gris variety in Domaine de la Grande Ferrade being less parasitized than those from the other vineyards. Larvae sampled from the Pinot Noir variety at Oeuilly were less parasitized than those collected from the other three vineyards. Larvae collected from the Chardonnay variety at Domaine de Boisviel and Mercier were more parasitized than those collected at Domaine de la Grande Ferrade and Villiers. The vineyard of collection also affected the body size of larvae from the Pinot Gris and Chardonnay varieties (Table 2). Larvae collected from the Pinot Gris variety in Alsace (Cave de Beblenheim and Turckheim) were larger than those collected in Domaine de la Grande Ferrade. Larvae sampled from the Chardonnay variety at Domaine de la Grande Ferrade were smaller than those collected from the other vineyards.

**Table 2:** Vineyard effect for each grape variety with respect to haemocyte count, PO activity, total-PO activity, antimicrobial activity, successful parasitism and larval body size. *P* values  $\leq 0.05$  are shown in bold. <sup>a</sup>NBGLM; <sup>b</sup>Kruskal-Wallis rank sum test; <sup>c</sup>Pearson  $\chi^2$  tests; <sup>d</sup>ANOVA. The letters indicate which vineyards were compared. A: vineyards CBG and CBG were compared; B: vineyards MER and OE were compared; C: vineyards CB, MER, OE and TK were compared; D: vineyards CB, DGF and TK were compared; E: vineyards DB, DGF, MER and VI were compared. The outcome of these multiple statistical tests was validated by the probability *p* ( $p < 0.0001$ ) calculation of having *k* ( $k = 14$ ) significant tests over *N* ( $N = 30$ ) performed tests following  $p = [N!/(N-K)!K!] \times \alpha^K(1-\alpha)^{N-K}$  (Moran 2003).

| Grape varieties<br>df                | Haemocyte<br>count <sup>a</sup> |               | PO activity <sup>b</sup> |               | Total-PO<br>activity <sup>b</sup> |               | Antimicrobial<br>activity <sup>c</sup> |               | Parasitism<br>success <sup>c</sup> |               | Body size <sup>d</sup> |               |
|--------------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|------------------------|---------------|
|                                      | $\chi$                          | <i>P</i>      | $\chi$                   | <i>P</i>      | $\chi$                            | <i>P</i>      | $\chi^2$                               | <i>P</i>      | $\chi^2$                           | <i>P</i>      | <i>F</i>               | <i>P</i>      |
| Chardonnay <sub>4</sub> <sup>E</sup> | <b>6.223</b>                    | <b>0.0007</b> | <b>18.15</b>             | <b>0.0004</b> | <b>23.46</b>                      | <b>0.0001</b> | <b>14.25</b>                           | <b>0.003</b>  | <b>44.95</b>                       | <b>0.0001</b> | <b>13.84</b>           | <b>0.0001</b> |
| Gamay <sub>1</sub> <sup>A</sup>      | 1.32                            | 0.25          | 0.92                     | 0.34          | 0.096                             | 0.76          | 0.009                                  | 0.92          | 0.13                               | 0.72          | 0.32                   | 0.57          |
| Meunier <sub>1</sub> <sup>B</sup>    | 1.51                            | 0.22          | 0.22                     | 0.64          | 0.0015                            | 0.97          | 0.02                                   | 0.88          | 0.65                               | 0.42          | 0.006                  | 0.94          |
| Pinot Noir <sub>4</sub> <sup>C</sup> | 5.95                            | 0.11          | 5.78                     | 0.12          | <b>8.61</b>                       | <b>0.03</b>   | <b>8.73</b>                            | <b>0.03</b>   | <b>66.68</b>                       | <b>0.0001</b> | 0.03                   | 0.99          |
| Pinot Gris <sub>2</sub> <sup>D</sup> | <b>18.76</b>                    | <b>0.0001</b> | 5.61                     | 0.06          | <b>9.11</b>                       | <b>0.01</b>   | <b>27.89</b>                           | <b>0.0001</b> | <b>52.49</b>                       | <b>0.0001</b> | <b>5.6</b>             | <b>0.005</b>  |

### Relationship between immune parameters, successful parasitism, body size and temperature among different larval populations

A strong positive and statistically significant relationship was found between the four immune parameters measured among the populations tested (Table 3). From these immune parameters we obtained a summary value for the immune system (PC1), which was strongly positively correlated with the four immune parameters (Table 4).

**Table 3:** Spearman rank correlation coefficients (with p-value and C.I.) between four immune system parameters (haemocyte count, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) in the haemolymph of *L. botrana* populations. Values in bold indicate significant correlations.

|                        | Haemocyte count | PO activity                          | Total-PO activity                    | Antimicrobial activity               |
|------------------------|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Haemocyte count        | -               | <b>0.81 ; 0.0001</b><br>[0.63; 0.89] | <b>0.78 ; 0.0001</b><br>[0.54; 0.90] | <b>0.73 ; 0.0001</b><br>[0.49; 0.87] |
| PO activity            |                 | -                                    | <b>0.86 ; 0.0001</b><br>[0.65; 0.94] | <b>0.75 ; 0.0001</b><br>[0.53; 0.88] |
| Total activity         |                 |                                      | -                                    | <b>0.55 ; 0.002</b><br>[0.21; 0.78]  |
| Antimicrobial activity |                 |                                      |                                      | -                                    |

**Table 4:** Principal component analysis for four immune system parameters (haemocyte count, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) in the haemolymph of *L. botrana*. Component loadings describe the relationships between the first principal component (PC1) and the variables from which they were derived.

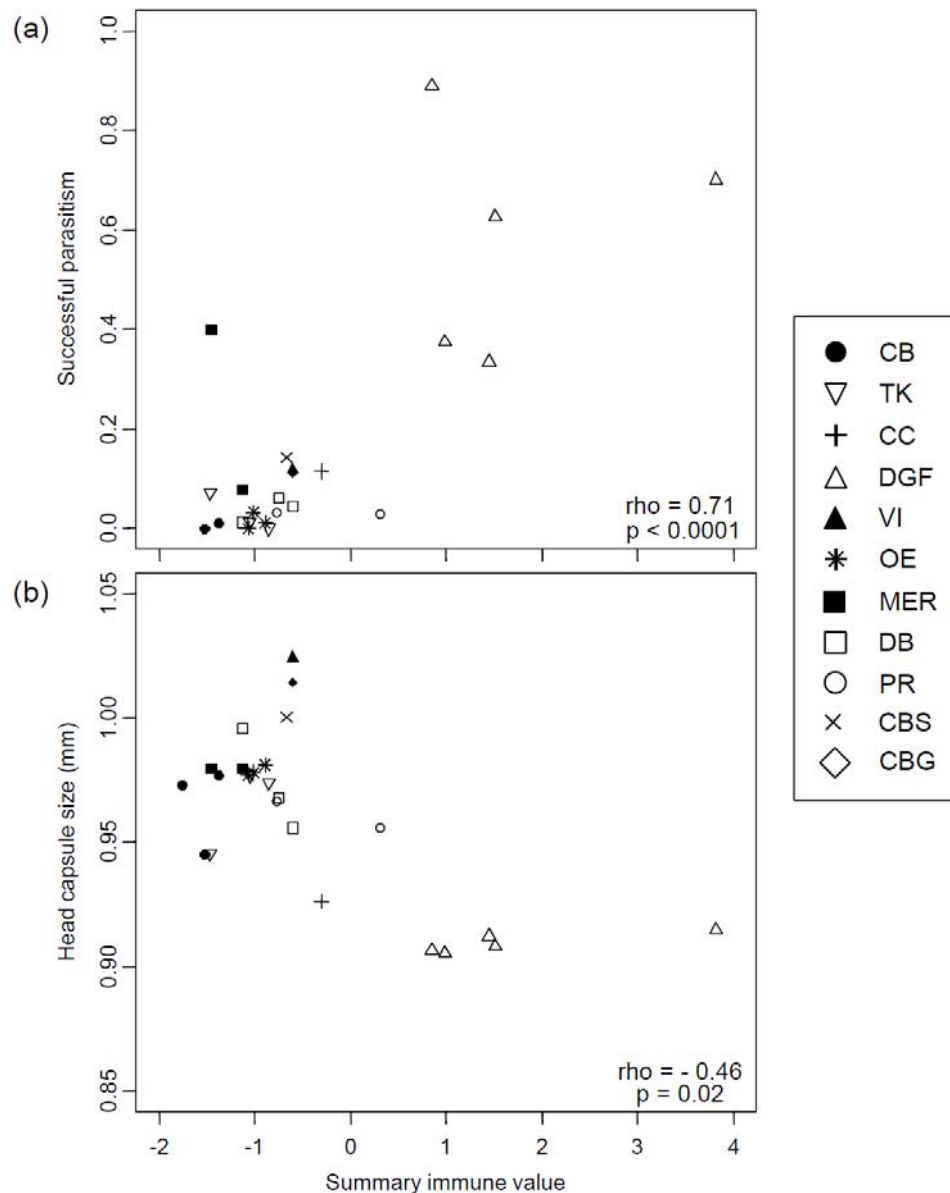
|                        | PC1   |
|------------------------|-------|
| Eigenvalue             | 3.05  |
| Explained variance (%) | 76.22 |
| Component loading      |       |
| Haemocyte count        | 0.92  |
| PO activity            | 0.94  |
| Total-PO activity      | 0.90  |
| Antimicrobial activity | 0.79  |

The summary immune value was positively correlated with the successful parasitism (Spearman's rank correlation coefficient: between grape varieties:  $\rho = 0.71$ ;  $p < 0.0001$ ; C.I. = [0.37; 0.90]; Fig. 5a). In addition, the summary immune value was negatively correlated with larval head capsule size (Spearman's rank correlation coefficient: between grape varieties:  $\rho = -0.46$ ;  $p = 0.02$ ; Fig. 5b). However, the confidence interval included 0 (C.I. = [-0.78; 0.2]), suggesting that this correlation is rather weak.

Figure 5 suggests that the correlations between successful parasitism or head capsule size with the summary immune value are driven by samples from the DGF vineyard. When removing this particular vineyard (DGF) from the data analysis, the positive correlation between PC1 and the successful parasitism remains (Spearman's rank correlation coefficient:  $\rho = 0.46$ ;  $p = 0.02$ ; C.I. = [0.2; 0.81]). However, the head capsule size was not correlated anymore to the summary value of the immune system (Spearman's rank correlation coefficient:  $\rho = 0.02$ ;  $p = 0.9$ ; C.I. = [-0.51; 0.59]).

Finally, when considering the vineyards only, the summary immune value was positively correlated with the successful parasitism (Spearman's rank correlation coefficient between vineyards:  $\rho = 0.66$ ;  $p = 0.01$ ; C.I. = [0.1; 0.96]) but not with larval head capsule size (Spearman's rank correlation coefficient between vineyards:  $\rho = -0.30$ ;  $p = 0.38$ ; C.I. = [-0.82; 0.60]).

Moreover, the summary immune value was also positively correlated with temperature (Spearman's rank correlation coefficient:  $\rho = 0.65$ ;  $p < 0.0001$ ; C.I. = [0.33; 0.85]); larval populations having high summary values came from the warmest geographical locations. Similar results were found when removing the DGF vineyard (Spearman's rank correlation coefficient:  $\rho = 0.66$ ;  $p = 0.002$ ; C.I. = [0.31; 0.86]), or when considering vineyards only in the analysis (Spearman's rank correlation coefficient between vineyards:  $\rho = 0.78$ ;  $p = 0.002$ ; C.I. = [0.29; 0.97]).



**Figure 5:** Correlation between summary values for the immune system (obtained from principal components analysis) and (a) the successful parasitism in the various vineyards and (b) the head capsule size in the various vineyards. For (a) and (b), the symbols represent vineyards.

#### 4. DISCUSSION

In this study we found evidence for a marked geographical variation in immune defence and the prevalence of parasitoid infection among natural populations of the grapevine moth, *L. botrana*. All the immune parameters assessed during this study (haemocyte count, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) were strongly and positively correlated at the population scale. Larval immune system activation among the larval populations was also strongly positively correlated to the successful parasitism and the local

mean temperature. These results are consistent with the hypothesis that parasitoid infection selects for greater investment in the immune system in *L. botrana*. Because immunity is costly (Ilmonen et al. 2000, Kraaijeveld and Godfray 1997, Moret and Schmid-Hempel 2000, Sadd and Siva-Jothy 2006), a negative relationship between investments in immune defence and larval body size was expected, revealing a trade-off between these fitness components. Such a relationship was indeed found but it was mainly due to samples from one vineyard (DGF) only. This results confirm that the cost of immunity remain difficult to evidence in natural populations (Cornet et al. 2009) despite the fact that previous study has already found such a trade-off (Rantala and Roff 2005).

The geographical location of the vineyards and the grape variety affected the immune system of *L. botrana* larvae. For several vineyards (Turckheim, Domaine de la Grande Ferrade, Plateau de Roquemartine and Domaine de Boisviel) the grape variety influenced variations in haemocyte counts and antimicrobial activity in the larvae. This is consistent with previous experimental findings that for the tortricid sibling species, *Eupoecilia ambiguella*, the host plant variety affects the expression of immune defence (Vogelweith et al. 2011). The immune system parameters varied for larvae collected from the Chardonnay, Pinot Gris and Pinot Noir varieties from different vineyards, indicating that the parameters were affected by the geographical area sampled. The mean local temperature varied along a North–South gradient (North: Champagne-Ardenne, Alsace; South: Aquitaine, Provence-Alpes-Côte d’Azur), which could explain geographical variations within the same grape variety (Chardonnay, Pinot Gris and Pinot Noir). Indeed, we found a positive relationship between the summary immune defence values and the mean temperature recorded during the two months prior to sampling. Empirical evidence suggests that the activity of the insect’s immune defence system is dependent on the ambient temperature, but that warm temperatures can either decrease or increase the activity of some immune effectors (Linder, Owers & Promislow 2008; Adamo & Lovett 2011). In our study larvae sampled in the southern area from the Chardonnay, Pinot Gris and Pinot Noir varieties tended to have a greater number of haemocytes and a higher level of antimicrobial activity than larvae sampled from these varieties in the northern area (Fig. 2-3). Unfortunately, our data did not enable us to establish whether the elevated immunocompetence observed in populations sampled from southern France directly resulted from warmer temperatures experienced by the larvae. It is possible that we observed the result of natural selection or an indirect effect mediated by parasitoid pressure. Indeed, the populations showing greatest immune investment were those that were exposed to both higher temperatures and greater parasitoid pressure. Laboratory experiments

will be needed to confirm the effect of temperature on the immune defence of larvae of *L. botrana*, and distinguish between the direct or indirect effect (see Adamo and Lovett 2011 for an example). In addition to the effects of grape variety and geographical location, the presence of parasitoids in the vineyard may be a major factor modulating the immune system of *L. botrana*.

In French and Swiss vineyards successful parasitism (or prevalence of infection by parasitoids) has been shown to be highly variable among different geographical regions (Moreau et al. 2010). We found a high prevalence of infection of larvae by parasitoids in the Domaine de la Grande Ferrade (DGF), but no parasitoids in Cave de Beblenheim (DB). This marked variation in the successful parasitism among our sampling areas enabled us to examine how this variation related to immunological investment. We assumed that the immune effectors studied are relevant to the insect's immunocompetence with respect to a broad range of pathogens (from micro to macro parasites). We found that the populations having high levels of immune defence (high haemocytes count, PO enzymes and antimicrobial peptides) were also those that had the highest level of parasitoid infection. This result provides strong evidence that parasitoid selective pressure shapes host investment in immune defences as already observed for other parasites in invertebrates (Bryan-Walker, Leung & Poulin 2007; Corby-Harris & Promislow 2008). Two non-mutually exclusive hypotheses can be proposed to explain the covariation between the prevalence of parasitoid infection and the level of investment in immune defence in our study.

The first hypothesis is that the presence of parasitoids in the local environment may induce the host to plastically increase their investment in immune defence. Thus, in this scenario the larvae of *L. botrana* would assess cues related to the presence of parasitoids, and adjust their investment in immunity to match any increased threat of infection. Although the ability to sense changes in the risk of predation or parasitism through visual, chemical or mechanical cues has been reported for some insect species (Peacor 2003; Fievet, Lhomme & Outreman 2008), there is currently no evidence suggesting that *L. botrana* has this ability.

The second hypothesis is that covariation between the prevalence of parasitoid infection and immune defence results from local adaptation of the host to the parasitoid selective pressure. This hypothesis implies the occurrence of genetic differentiation among populations in terms of investment in immune defence. Populations characterized by higher prevalence of infection by parasitoids face greater selective pressure, thus favouring hosts with high capacity for investment in immune function. This hypothesis assumes that local parasitoid pressure remains constant within populations for several generations. However, the

temporal variation in parasitoid infection prevalence preceding our study is unknown. The hypothesis of local adaptation may be supported by the low dispersal capacity of adult grapevine moths (Thiéry and Moreau 2005). Additional research is needed to clarify the relative contribution of each of the above hypotheses in explaining the patterns of variation observed in our study.

Overall, these findings are consistent with parasitoids having a substantial role as selective forces shaping host immune defences. Our study highlights major bottom-up and top-down forces on the immune system of this herbivore. Studies of this kind are central to understanding the selective forces on the immune systems of phytophagous populations. However, further research is necessary to clarify the influence of grape variety on the immune system, and to establish whether immune capacity is the result of local adaptation or phenotypic plasticity.

### **Acknowledgements**

We thank A. Bauer, A. Balourdet, O. Bonnard, L. Delbac, M. Gaillard, P. Kuntzman, Leroux, K. Monceau, P. Petitot, P. Pienne, D. Richy, J-P. Troussard and A. Vincent-Boudrot. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006) and from the Conseil Regional of Bourgogne. We also thank the Conseils Régionaux of Alsace, Aquitaine, Bourgogne, Champagne-Ardenne, PACA and Rhône-Alpes. We thank the vine growers and vineyard owners who allowed us to sample in their vineyards.

### **References**

- Adamo SA, Lovett MME (2011) Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Experimental Biology* 214 (12):1997-2004. doi:10.1242/jeb.056531
- Ayres JS, Schneider DS (2009) The Role of Anorexia in Resistance and Tolerance to Infections in *Drosophila*. *Plos Biology* 7 (7). doi:10.1371/journal.pbio.1000150
- Ayres JS, Schneider DS (2012) Tolerance of Infections. In: Paul WE (ed) *Annual Review of Immunology*, vol 30. *Annual Review of Immunology*. pp 271-294. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075030
- Barnes AI, Siva-Jothy MT (2000) Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of

- investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:177-182
- Bryan-Walker K, Leung TLF, Poulin R (2007) Local adaptation of immunity against a trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology* 152 (3):687-695. doi:10.1007/s00227-007-0725-x
- Bukovinszky T, Poelman EH, Gols R, Prekatsakis G, Vet LEM, Harvey JA, Dicke M (2009) Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immune defence of a herbivore against parasitism. *Oecologia* 160 (2):299-308. doi:10.1007/s00442-009-1308-y
- Cerenius L, Soderhall K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198:116-126. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- Coley PD, Bateman ML, Kursar TA (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos* 115 (2):219-228
- Corby-Harris V, Promislow DEL (2008) Host ecology shapes geographical variation for resistance to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Animal Ecology* 77 (4):768-776. doi:10.1111/j.1365-2656.2008.01399.x
- Cornet S, Biard C, Moret Y (2009) Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia* 159:257-269
- Cotter SC, Simpson SJ, Raubenheimer D, Wilson K (2011) Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits. *Functional Ecology* 25 (1):186-198. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01766.x
- Delbac L, Lecharpentier P, Thiéry D (2010) Larval instars determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Protection* 29:623-630
- Fievet V, Lhomme P, Outreman Y (2008) Predation risk cues associated with killed conspecifics affect the behavior and reproduction of prey animals. *Oikos* 117 (9):1380-1385. doi:10.1111/j.2008.0030-1299.16629.x
- Gabel B, Thiery D (1996) Oviposition response of *Lobesia botrana* females to long-chain free fatty acids and esters from its eggs. *Journal of Chemical Ecology* 22 (1):161-171. doi:10.1007/bf02040207
- Godin J, Maltais P, Gaudet S (2002) Head capsule width as an instar indicator for larvae of the cranberry fruitworm (Lepidoptera: Pyralidae) in southeastern New Brunswick. *Journal of Economic Entomology* 95:1308-1313

- Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J (2008) Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Science* 322 (5905):1257-1259. doi:10.1126/science.1165265
- Hairston NG, Smith FE, Slobodkin LB (1960) COMMUNITY STRUCTURE, POPULATION CONTROL, AND COMPETITION. *American Naturalist* 94 (879):421-425. doi:10.1086/282146
- Hawkins BA, Cornell HV, Hochberg ME (1997) Predators, parasitoids and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* 78:2145-2152
- Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 8 (1):8-13. doi:10.1016/s0952-7915(96)80098-7
- Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D (2000) Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 267 (1444):665-670
- Iwanaga S, Lee BL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2):128-150
- Kalbe M, Kurtz J (2006) Local differences in immunocompetence reflect resistance of sticklebacks against the eye fluke *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasitology* 132:105-116. doi:10.1017/s0031182005008681
- Klemola T, Klemola N, Andersson T, Ruohomaki K (2007) Does immune function influence population fluctuations and level of parasitism in the cyclic geometrid moth? *Population Ecology* 49 (2):165-178. doi:10.1007/s10144-007-0035-7
- Kraaijeveld AR, Godfray HCJ (1997) Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 389 (6648):278-280
- Kraaijeveld AR, Vanalphen JJM (1995) Foraging behavior and encapsulation ability of *Drosophila melanogaster* larvae - correlated polymorphisms - (Diptera, Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior* 8 (3):305-314
- Lazzaro BP, Little TJ (2009) Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364 (1513):15-26. doi:10.1098/rstb.2008.0141
- Linder JE, Owers KA, Promislow DEL (2008) The effects of temperature on host-pathogen interactions in *D-melanogaster*: Who benefits? *Journal of Insect Physiology* 54 (1):297-308. doi:10.1016/j.jinsphys.2007.10.001
- Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP (2012) Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science* 335 (6071):936-941. doi:10.1126/science.1214935
- Moran MD (2003) Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* 100 (2):403-405. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12010.x

- Moreau J, Benrey B, Thiery D (2006a) Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? *Functional Ecology* 20 (4):592-600. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01145.x
- Moreau J, Benrey B, Thiery D (2006b) Grape variety affects larval performance and also female reproductive performance of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* 96:205-212
- Moreau J, Villemant C, Benrey B, Thiery D (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): The influence of region and cultivar. *Biological Control* 54 (3):300-306. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.05.019
- Moret Y (2006) 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273 (1592):1399-1405. doi:10.1098/rspb.2006.3465
- Moret Y, Schmid-Hempel P (2000) Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290 (5494):1166-1168. doi:10.1126/science.290.5494.1166
- Nakagawa S (2004) A farewell to Bonferroni: the problems of low statistical power and publication bias. *Behavioral Ecology* 15 (6):1044-1045. doi:10.1093/beheco/arh107
- Nappi AJ, Ottaviani E (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 22 (5):469-480.
- Panzavolta T (2007) Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. *Environmental Entomology* 36:1054-1058
- Peacor SD (2003) Phenotypic modifications to conspecific density arising from predation risk assessment. *Oikos* 100 (2):409-415. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12043.x
- Pletcher SD, Macdonald SJ, Marguerie R, Certa U, Stearns SC, Goldstein DB, Partridge L (2002) Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 12 (9):712-723. doi:10.1016/s0960-9822(02)00808-4
- Ponton F, Wilson K, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ (2011) Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *PLoS Pathog* 7 (12). doi:10.1371/journal.ppat.1002223
- Povey S, Cotter SC, Simpson SJ, Lee KP, Wilson K (2009) Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? *Journal of Animal Ecology* 78 (2):437-446. doi:10.1111/j.1365-2656.2008.01499.x

- Rantala MJ, Roff DA (2005) An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology* 19:323-330.
- Roehrich R, Boller E (1991) Tortricids in vineyards. In: Van der Gesst LPS, Evenhuis HH (ed) *Tortricid pests, their biology natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam, pp 507-514
- Sadd BM, Siva-Jothy MT (2006) Self-harm caused by an insect's innate immunity. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273 (1600):2571-2574. doi:10.1098/rspb.2006.3574
- Schmid-Hempel P (2003) Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270 (1513):357-366. doi:10.1098/rspb.2002.2265
- Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11 (8):317-321. doi:10.1016/0169-5347(96)10039-2
- Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J (2005) Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. In: Simpson SJ (ed) *Advances in Insect Physiology*, vol 32. *Advances in Insect Physiology*. pp 1-48. doi:10.1016/s0065-2806(05)32001-7
- Siva-Jothy MT, Thompson JJW (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology* 27 (3):206-212. doi:10.1046/j.1365-3032.2002.00286.x
- Smilanich AM, Dyer LA, Chambers JQ, Bowers MD (2009) Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecology Letters* 12 (7):612-621. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01309.x
- Thiéry D (2008) *Les ravageurs de la Vigne*. Féret, Bordeaux
- Thiery D, Gabel B (1993) Inter-specific avoidance of egg-associated semiochemicals in 4 Tortricids. *Experientia* 49 (11):998-1001. doi:10.1007/bf02125648
- Thiery D, Moreau J (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia* 143:548-557
- Tinsley MC, Blanford S, Jiggins FM (2006) Genetic variation in *Drosophila melanogaster* pathogen susceptibility. *Parasitology* 132:767-773. doi:10.1017/s0031182006009929
- Torres-Vila LM, Stockel J, Rodriguez-Molina MC (1997) Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Physiological Entomology* 22 (4):387-393. doi:10.1111/j.1365-3032.1997.tb01184.x

- Vogelweith F, Thiery D, Quaglietti B, Moret Y, Moreau J (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology* 25 (6):1241-1247. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01911.x
- Vogelweith F, Thiery D, Moret Y, Moreau J (2013) Immunocompetence increases with larval body size in a phytophagous moth. *Physiological Entomology* 38 (3):219-225. doi:10.1111/phen.12025
- Zuk M, Stoehr AM (2002) Immune defense and host life history. *American Naturalist* 160:S9-S22. doi:10.1086/342131

## ANNEXE 5

### WHICH PROCESSES SHAPE THE GRAPEVINE MOTH IMMUNE RESPONSE AGAINST PARASITISM?

VOGELWEITH, F.<sup>1</sup>, MORET, Y.<sup>1</sup>, THIERY, D.<sup>2</sup>, DELBAC, L.<sup>2</sup> & MOREAU, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup>INRA UMR 1065 Save, Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France

Key-words: insect immune system, phenotypic plasticity, selection of immune defenses, successful parasitism.

#### 1. INTRODUCTION

Immune function is likely to be a critical determinant of an organism's fitness, yet natural populations exhibit great variation for immune traits. Such a variation is assumed to result from environmental heterogeneity and pathogen diversity. Parasite epidemics fluctuate and abiotic factors such as temperature, food availability and food quality are unsettled. Hence, the natural context in which host parasites interact is often noisy, which can maintain host variation in immune function by favoring alternative host genotypes over time and space (Lazzaro and Little 2009).

Nevertheless, natural variation in immune defense can exhibit conserved trends of co-variation with environmental factors, which may induce either plastic short-term responses or responses to natural selection. For instances, food availability and parasite infections are known to induce transient alterations of the host immune system (Lochmiller et al. 1993; Gonzalez et al. 1999; Mucklow et al. 2004). In addition, when parasitic threat is variable in time and host could sense cues predicting changes in the risk of infection, host might plastically modulate its immune response according to the anticipate risk of infection in its current environment. For example, when the risk of parasitism increases, even in the absence of parasites, insects show prophylactic investment in immune defense (Barnes and Siva-Jothy 2000; Pham and Schneider 2008; Chambers and Schneider 2012). Such a plastic investment in immunity is then likely to result in a positive covariation between parasite prevalence and immune defense. Beside, parasites are locally expected to mediate a selective response in favor of high levels of immune defense among hosts, which should translate as well in a

positive covariation between parasite prevalence and immune investments (Kalbe and Kurtz 2006; Tschirren and Richner 2006; Lindstrom et al. 2004).

As stated above, patterns of natural covariation between host immune defense and parasite prevalence could result from at least two not mutually exclusive origins. As each phenomenon may have different implications in the co-evolutionary dynamics of host and parasites (Little and Kraaijeveld 2004; Reynolds et al. 2011), disentangling whether covariation between immune defense and parasite prevalence in the field results from plastic adjustments of immune defense or responses to selection appears of primary importance.

Tritrophic systems involving insect herbivores, their host plants and natural enemies provide a useful model for addressing issues related to ecological immunology, especially with regard to the potential combined effects of parasitism and nutrition on the evolution of host immune defenses in natural populations. Indeed, the relative performance of phytophagous insects is classically constrained by selective forces imposed by both their host plants and natural enemies, imposing bottom-up and top-down selection pressures, respectively (Hairston et al. 1960; Tscharncke and Hawkins 2002; Miller 2008). Through their relative composition of nutrients and toxic defensive compounds, host plants affect the condition of phytophagous insects (Coley et al. 2006; Smilanich et al. 2009), with major consequences for the expression of immune defense systems (Vogelweith et al. 2011; Bukovinszky et al. 2009; Klemola et al. 2007). Hence, host plants have the potential to influence either directly or indirectly the evolving physiology of the phytophagous insect immune system. In addition, parasitoids are major sources of mortality among natural populations of insect herbivores (Hawkins et al. 1997; Smilanich et al. 2009). If locally persistent, parasitoids have the strong potential to impose selective pressure on the immune system of the phytophagous insect. Alternatively, if parasitoid pressure varies in time, parasitoids may induce plastic adjustments of their host immune system as prophylaxis.

Like in other insects, the immune system of the major pest in vineyard, the European grapevine moth (*Lobesia botrana*), relies on haemocytes, freely circulating cells in the haemolymph that are involved in the clearance of microbes through phagocytosis and nodulation and the isolation of larger intruders through encapsulation. Humoral effectors include the prophenoloxidase (PPO) system (Marmaras and Lampropoulou 2009), an enzymatic component of the oxidative and melanisation defenses employed against eukaryotic parasites such as parasitoid eggs (Cerenius and Soderhall 2004). In addition, the specific recognition of microorganism walls induces the production of antimicrobial peptides (Imler and Bulet 2005). Recent investigations among natural populations of *Lobesia botrana*,

revealed that level of immune defense in larvae was variable across host plant variety, and positively correlated to parasitoid infection prevalence (Vogelweith et al. in press). Indeed, at a geographical scale, populations having high levels of immune defense (haemocytes concentration, PO-PPO enzymes activity and antimicrobial peptides) were also those that had the highest successful parasitism (Vogelweith et al. in press). While this confirms that parasitoid prevalence strongly affects investment of their host to immune defenses (Bryan-Walker et al. 2007; Corby-Harris and Promislow 2008), whether such a covariation results from plastic adjustments of the host immune system or local responses to selection remains unknown.

Here we examined both possibilities to explain this correlation between immunity and successful parasitism in *L. botrana*. Plastic adjustment of *L. botrana* immune system as prophylaxis was examined by exposing either young or old larvae to different parasitoids known to be natural enemies of this moth species for six days and then measure resulting changes in keys immune parameters (haemocytes concentration, activity of the PO-PPO system and antimicrobial activity). Local response to selection was investigated by sampling larvae from different vineyards for which data on the successful parasitism were recorded yearly for the past two to five years to measure levels of immune defenses. Under the hypothesis of a local response to selection, larvae from vineyards in which the successful parasitism of parasitoids were historically high are expected to exhibit genetically high immunological investments. Conversely, larvae from vineyards in which the successful parasitism of parasitoids were historically low are expected to exhibit genetically low immunological investments.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **(a) Model insect**

*Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) is currently the major grape pests in Europe. Larvae used in this study to test the plastic effect (part b) are descendant from a large number of larvae collected at autumn in a Sauternes vineyard (southwestern France) (Thiery and Moreau 2005). The laboratory culture is maintained diapause free at the INRA of Bordeaux Aquitaine, (France). Larvae were maintained in boxes (18 × 11.5 × 7 cm) under standard laboratory conditions (22 ± 1°C, 70 ± 10% r.h., photoperiod: L16:D8) with *ad libitum* on semi-artificial diet (Thiery and Moreau 2005) at a density of 100 individuals per 300 ml of diet.

### **(b) Testing the hypothesis of a plastic change in immune defense**

Two experiments were performed separately in 2012 and 2013 with two different procedures to test larval immunocompetence elevation in presence of a natural enemy. In the first experiment, we used old larvae (4<sup>th</sup> larval instar, L4) exposed in groups to different species of parasitoids. In the second experiment, we used young larvae (2<sup>nd</sup> larval instar, L2) exposed individually to one parasitoid species only.

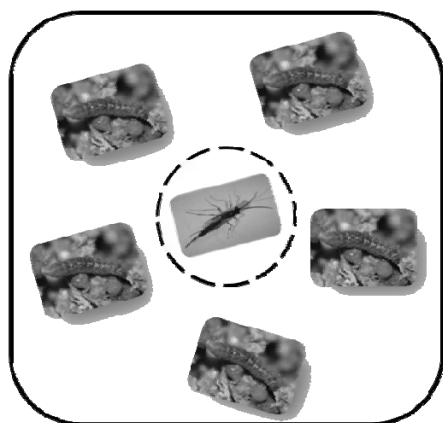
#### *First experiment*

As different parasitoids may induce different response in their host, we used in this first experiment two species of parasitoids, *Campoplex capitator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Phytomyptera nigrina* (Diptera: Tachinidae), to mimic imminent parasitoid attacks. These parasitoids are known to parasitize L2 to L4 larvae of *L. botrana*, can be sympatric in certain vineyards and occurred often in different vineyard in France (Thiéry 2008). The two parasitoid species were obtained from parasitized *L. botrana* larvae collected in a vineyard in Perpignan (southern France) in May 2012 following this specific procedure. Larvae were sampled at the end of their development in grapes, placed in the large boxes in the lab and were checked daily until pupation. Pupae were then placed individually in glass tubes (70 × 9 mm diameter) closed with cotton plugs, and stored at 23°C under ambient photoperiod conditions and checked daily until the emergence of either the moth or the parasitoid.

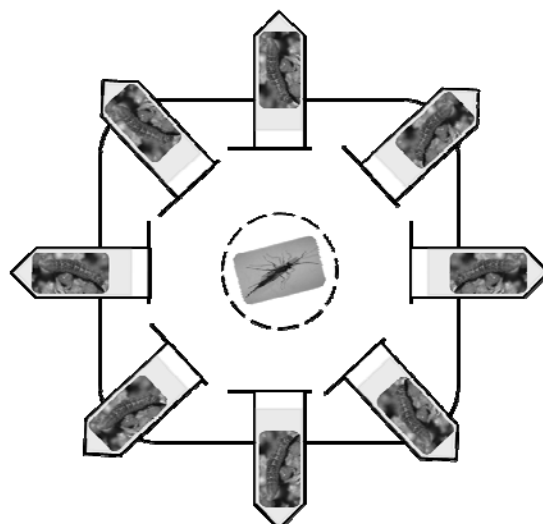
Fourth instar larvae of the laboratory strain of *L. botrana* were exposed in groups of five to either one of the female parasitoids (*C. capitator* or *P. nigrina*), the non-parasitoid vomiting green bottle fly (*Lucilia Caesar*, Diptera: Calliphoridae) or nothing. *L. caesar* was used as a non-parasitoid insect for control. The flies were obtained from a commercial source (Decathlon, Dijon, France). In the experimental set up, *L. botrana* larvae were placed in plastic boxes (98 × 98 × 49 mm) containing 50 ml of semi-artificial diet (Thiéry and Moreau 2005) (Fig. 1a). A plastic cup (30 mm diameter and 30 mm height) either containing one adult of *C. capitator* (n = 6 parasitoids; n = 30 larvae), *P. nigrina* (n = 6 parasitoids; n = 30 larvae), or nothing (n = 5 parasitoids; n = 20 larvae) was positioned in the middle of each box. The central cup was transparent and pierced of little holes, allowing visual, olfactory and vibratory stimulation of *L. botrana* larvae by the threatening insects. The threatening insects were offered a drop of honey as food for the duration of the experiment. Experimental boxes were maintained in standard laboratory conditions (22 ± 1°C, 70 ± 10% r.h., photoperiod: L16:D8). Six days later, each larva were subjected to a sample of haemolymph for measurements, of

the concentration of haemocytes and activity of the PO-PPO system as described in Vogelweith et al. (2011). Larvae that reached metamorphosis could not be sample for haemolymph.

(a)



(b)



**Figure 1:** Diagram of the experimental devices testing the hypothesis of a plastic change in immune defense. (a) First experiment, the big square represents the plastic box with the diet (light grey) and the larvae and the dotted circle represents the plastic cup with a female parasitoid. (b) Second experiment, the big square represents the plastic box with the centrifuge tubes containing diets and larvae, and the dotted circle represents the plastic cup with a female parasitoid.

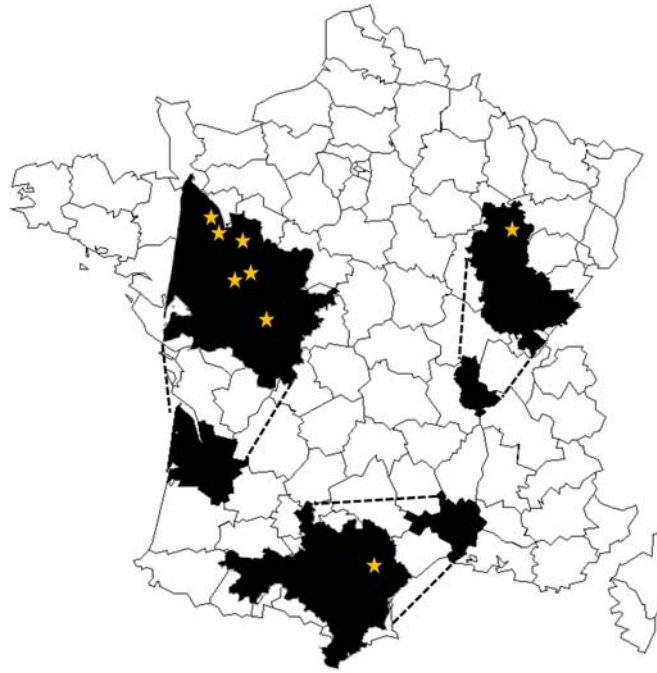
### *Second experiment*

In the second experiment, second instar larvae (same strain as above) were individually reared in centrifuge tubes filled with 1.5 mL of semi-artificial diet, which is enough for the larvae to complete development (Thiery and Moreau 2005). Lids of the tubes were pierced to allow air circulation. Tubes containing larvae were attached to a plastic box (98 × 98 × 49 mm). In the middle of the box was placed a plastic cup (30 mm diameter and 30 mm height) either containing a female *C. capitator* (n = 4 parasitoids; n = 32 larvae) obtained as the same procedure described above or nothing (n = 2 parasitoids; n = 16 larvae) (Fig. 1b). The central cup was transparent and pierced of minute holes, allowing visual, olfactory and vibratory stimulation of the larvae of *L. botrana* by the threatening insects. The threatening insects were offered a drop of honey as food for the duration of the experiment. Experimental boxes were maintained in standard laboratory conditions (22 ± 1°C, 70 ± 10% r.h., photoperiod: L16:D8). Six days later, larvae were as above subject to a sample of haemolymph for immune measures.

### **(c) Testing the hypothesis of a response to selection**

To assess if immune system of larvae were selected by parasitoid pressure, prevalence of infection was monitored each year between 2008 and 2012. Parts of the larvae sampled in 2012 were used to evaluate larval immune system.

Four French viticultural regions (Aquitaine, Languedoc-Roussillon, Provence-Alpes-Côte d'Azur and Rhône-Alpes) were sampled every year in spring (May), corresponding to the end of the first moth generation (Fig. 2). In each region, different vineyards (and grape varieties) were used: Château Brillette 'CB' (Cabernet Franc), Château Climens 'CC' (Sémillon), Château l'Escart 'CE' (Merlot), domaine de la Grande Ferrade 'DGF' (Merlot and Sauvignon), domaine de Latresne 'DL' (Merlot), le Grand Puy Lacoste 'PL' (Merlot), Le Grand Vallat 'SVC' (Merlot), plateau de Roquemartine 'PR' (Grenache) and Le bois 'CH' (Gamay) (Fig. 2). For each variety larvae were collected only when the occurrence of the moth larvae on the grapes was beyond 20 larvae per 100 bunches. Larvae were collected at the end of their larval development (fifth instar stage). Larvae of *L. botrana* can almost not move from one bunch to another, and consequently each larva was assumed to have completed its development on the bunch from which it was collected. Sampled larvae were maintained in polyethylene boxes (60 × 40 × 21.4 cm) at 24 ± 1°C, 60 ± 10% rh., under ambient photoperiod conditions and were fed *ad libitum* on grape bunches from the locality of collection.



**Figure 2:** Map of the locations of the French vineyards sampled in the study. Department are in black and stars represents the different vineyards.

Successful parasitism was evaluated by checking larvae daily until pupation, using the procedure described above for parasitoid collection. Successful parasitism was calculated as:  $[\text{number of parasitoids} / (\text{number of } L. \text{ botrana} + \text{number of parasitoids emerged})] \times 100$ .

Apart from this general procedure, larvae collected in 2012 were randomly separated into two subsamples. One subsample was used to measure successful parasitism (see above). The second subsample was used to collect haemolymph for immune measures.

#### **(d) Collection of haemolymph and immune measures**

Individual larvae were chilled on ice for 20 min, then a 2  $\mu\text{l}$  sample of haemolymph was collected in a sterile glass capillary (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from a wound made in the posterior part of the ventral side of the abdomen. One  $\mu\text{l}$  of the haemolymph sample was transferred to a microcentrifuge tube containing 25  $\mu\text{l}$  of cold sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer (0.01M sodium cacodylate; 0.005M  $\text{CaCl}_2$ ; pH 6.5), and a 10  $\mu\text{l}$  sample of this solution was immediately removed for haemocyte counting; the remainder was stored at  $-27^\circ\text{C}$  for later measurement of the PO activity. The remaining haemolymph in the capillary (1  $\mu\text{l}$ ) was flushed into a microcentrifuge tube internally coated with n-phenylthiourea (Sigma P7629, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and containing 2  $\mu\text{l}$  of

cold sodium cacodylate/CaCl<sub>2</sub> buffer. The tube was stored at -27°C for further assessment of antibacterial activity.

Measure of the concentration of haemocyte was undertaken using an improved Neubauer haemocytometer counting chamber and phase contrast microscopy (magnification 400×). The activity of naturally activated PO enzymes (hereafter 'PO activity'), and the activity of the PPO proenzymes in addition to that of PO (hereafter 'total-PO activity') were measured using a spectrophotometer following the method described by Vogelweith et al. (2011). PO activity was quantified without further activation, while total-PO activity required conversion of the PPO to PO with chymotrypsin. For each sample the frozen haemolymph was thawed on ice and centrifuged (4000 × g, 15 min, 4°C). A sample of the supernatant (5 µl) was added to a microplate well containing 20 µl of PBS and either 140 µl of distilled water, to measure PO activity only, or 140 µl of chymotrypsin solution (Sigma C-7762, 0.07 mg/ml of distilled water) to measure total-PO activity. A volume of 20 µl of L-dopa solution (Sigma D-9628; 4 mg/ml of distilled water) was then added to each well. The reaction was allowed to proceed for 40 min at 30°C in a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices). Readings were made every 15 s at 490 nm, and the data were analyzed using SOFT-Max®Pro 4.0 software (Molecular Devices). Enzyme activity was measured as the slope (V<sub>max</sub> value: change in absorbance miliunits/min) of the reaction curve during the linear phase of the reaction, and was reported as the activity of 1 µl of pure haemolymph.

Antimicrobial activity in the haemolymph was measured using a standard zone of inhibition assay (Moret 2006). The samples were thawed on ice, and using the assay described below, were tested for antimicrobial activity, based on the formation of zones of inhibition in agar plates seeded with the bacterium *Arthrobacter globiformis*. A single colony of *A. globiformis* from a streak plate was inoculated into a broth medium (10 g bacto-tryptone, 5 g yeast extract and 10 g NaCl in 1000 ml of distilled water, pH 7.0) and incubated overnight at 30°C. From this culture the bacterium was inoculated into a broth medium containing 1% agar to achieve a final density of 10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup>. This inoculated agar medium (6 ml) was poured into a Petri dish and allowed to solidify. Wells for sample addition were made in the agar using a Pasteur pipette fitted with a ball pump. For each thawed test sample solution, 2 µl was added to a well in the agar plate. A positive control (tetracycline: Sigma T3383) was included in each plate. The plates were incubated for 48 h at 30°C, at which time the diameters of inhibition zones were measured.

#### **(e) Body size of larvae**

Body size of each larvae tested for immune defense was measured since we found that body size of *L. botrana* is correlated to immune defense (Vogelweith et al. 2013b). Body size of larvae was estimated by measuring the distance between the most distant lateral sides of the head capsule (HC) margins (Delbac et al. 2010) using a Nikon SMZ-10A stereoscopic microscope and a VTO 232 video analysis system (Linkam Scientific Instruments). HC width was found to be the most reliable estimator for body size in most Lepidopteran larvae (Godin et al. 2002; Panzavolta 2007; Delbac et al. 2010).

Since injuries or the presence of parasitoid eggs can affect immune defenses (Barnes and Siva-Jothy 2000), only non parasitized larvae, or larvae with no evidence of parasitoid sting injuries, were used in the measurement of immune parameters. To assess the status of larvae, each larva was carefully inspected using a binocular microscope (see characteristics above). After the immune collection, all larvae were dissected to control for possible effects of parasitoid eggs in the haemolymph on immune levels of larvae. Those larvae having visible infections (the presence of feeding injuries, parasitoid eggs or encapsulated parasitoid eggs) were excluded from the analysis.

#### **(f) Statistical analysis**

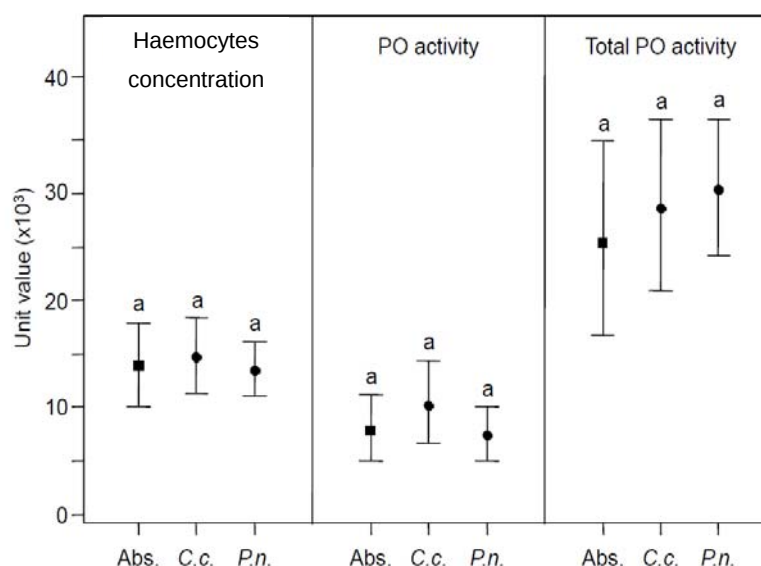
To examine the hypothesis of a plastic change in immune defense in presence of parasitoids, changes in immune defense parameters (haemocyte concentration and, PO and total-PO activities) were analyzed using a negative binomial generalized linear model (NBGLM) because the data exhibited negative binomial distribution.

To test the hypothesis of local response to selection, a principal component analysis was used to summarize the information for the various immune parameters into one orthogonal principal component (the summary immune value) describing basal level of immunity in the haemolymph of larvae. To investigate the relationship between the four immune parameters measured, the synthetic value of immune system and the successful parasitism, we used Spearman's rank correlation coefficient with confidence interval of 95% (C.I.), because the data were not normally distributed. When the C.I. included 0, the correlation was not significant. For all comparisons the level of significance was set at  $\alpha = 0.05$ . All statistical tests were performed using the R (version 3.0.1) software.

### 3. RESULTS

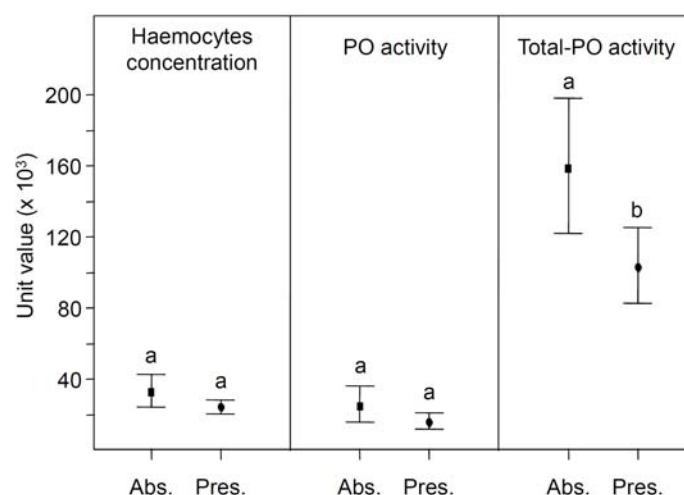
#### Testing the hypothesis of a plastic change in immune defense

In the first experiment, presence and species of parasitoids had no effect on the concentration of haemocyte, the PO and the total-PO activities (Fig 3; Table 1).



**Figure 3:** Immune response of *Lobesia botrana* larvae to parasitoid presence, in the first experiment. Average haemocytes concentration, PO activity and total-PO activity ( $\pm$  C.I. 95%) in the haemolymph of *L. botrana* following six days in the presence of the parasitoid *Campoplex capitator* (C.c.; black circle) or *Phytomyptera nigrina* (P.n.; black circle), or in the absence (black square) of any insect. Different letters represent significant differences within each immune parameter of *L. botrana*.

Similar results were obtained in the second experiment. The concentration of haemocyte and PO activity were not affected by the presence of parasitoid (Fig. 4; Table 1). Nevertheless, total-PO activity was more important in absence of parasitoid (Fig. 4).



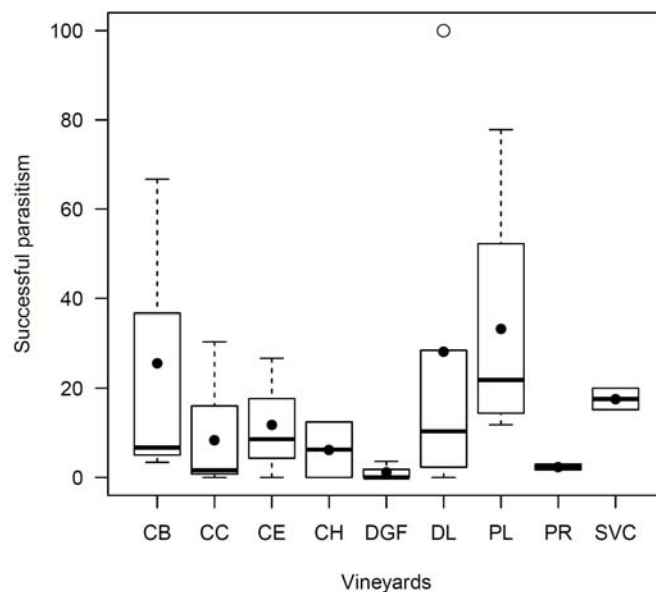
**Figure 4:** Immune response of *Lobesia botrana* larvae to parasitoid presence, in the second experiment. Average haemocytes concentration, PO activity and total-PO activity ( $\pm$  C.I. 95%) in the haemolymph of *L. botrana* following six days in the absence (Abs.; black circle) or presence of the parasitoid *Campoplex capitator* (Pres.; black circle). Different letters represent significant differences within each immune parameter of *L. botrana*.

**Table 1:** ‘Plastic effect’. Effect of parasitoid presence on concentration of haemocyte, PO activity and total-PO activity. P values  $\leq 0.05$  are shown in bold.

|                          | 1 <sup>st</sup> experiment |      | 2 <sup>nd</sup> experiment |             |
|--------------------------|----------------------------|------|----------------------------|-------------|
|                          | F                          | P    | F                          | P           |
| Haemocytes concentration | 0.26                       | 0.88 | 3.73                       | 0.06        |
| PO activity              | 1.63                       | 0.44 | 3.38                       | 0.06        |
| Total-PO activity        | 0.44                       | 0.80 | <b>4.86</b>                | <b>0.03</b> |

### Testing the hypothesis of a response to selection

The mean successful parasitism varied among the years. For instance, in 2011 the successful parasitism was very high (33 %) whereas it was very low in 2012 (3 %). In addition, the successful parasitism strongly varied among locations. Whatever the years of survey, the successful parasitism was very low for each year, in some locations like DGF or PR (Fig. 5) whereas larvae collected in PL, CB and DL has a higher probability of being parasitized. Some locations are intermediate in terms of successful parasitism (Fig. 5).



**Figure 5:** Successful parasitism (%) in the different vineyards tested between 2008 and 2012. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles, the central features are the medians, the dashed lines are the maxima and minima, and the black circles are the means. For each grape variety the number of larvae tested is shown below the x-axis. See the section material and methods for acronyms.

The concentration of haemocyte was positively correlated to successful parasitism (Table 2). *L. botrana* populations with higher haemocytes concentration were always the most parasitized (Table 2). However, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity were not related to successful parasitism (Table 2). Antimicrobial activity tended to be negatively correlated with successful parasitism.

**Table 2:** Spearman rank correlation coefficients (p-value and C.I. 95%) between the successful parasitism and, four immune system parameters (haemocytes concentration, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) and the synthetic value of immune system in the haemolymph of *L. botrana*. Values in bold indicate significant correlations.

|                                  | Successful parasitism |             |                     |
|----------------------------------|-----------------------|-------------|---------------------|
|                                  | $\rho$                | P           | C.I.                |
| Haemocytes concentration         | <b>0.72</b>           | <b>0.03</b> | <b>[0.03; 0.94]</b> |
| PO activity                      | 0.62                  | 0.07        | [-0.10; 0.90]       |
| Total-PO activity                | 0.65                  | 0.05        | [-0.03; 0.98]       |
| Antimicrobial activity           | -0.55                 | 0.12        | [-0.95; 0.28]       |
| Synthetic value of immune system | <b>0.77</b>           | <b>0.02</b> | <b>[0.01; 0.89]</b> |

The synthetic value of immune defenses was positively correlated with the concentration of haemocyte, PO and total-PO activities, but negatively with antimicrobial activity in the haemolymph of *L. botrana* (Table 3). Moreover, the synthetic value was positively correlated with the successful parasitism (Table 2). For instance, *L. botrana* populations with a high synthetic value of immune system were the most parasitized populations.

**Table 3:** Principal component analysis for four immune system parameters (concentration of haemocyte, PO activity, total-PO activity and antimicrobial activity) in the haemolymph of *L. botrana*. Component loadings describe the relationships between the first principal component (PC1) and the variables from which they were derived.

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Eigenvalue               | 2.41  |
| Explained variance (%)   | 60.24 |
| Component loading        |       |
| Haemocytes concentration | 0.62  |
| PO activity              | 0.88  |
| Total-PO activity        | 0.72  |
| Antimicrobial activity   | -0.73 |

#### 4. DISCUSSION

This study aimed to explain the positive correlation observed between parasitism success and effectors of the immune system, in natural population of *L. botrana* (Vogelweith et al. in press). We have put forward two non-exclusive hypotheses to explain such a relationship. The first hypothesis involves the induction of the investment in host immune defense, in response to successful parasitism. The second one involves a covariation between the successful parasitism and immune defense resulting from local response to selection of the host to the parasite selective pressure.

The first series of experiments were designed to test whether larvae of *L. botrana* could prophylactically enhance their immune defenses in response to cues produced by parasitoids. Many animals are able anticipate the presence of parasitoid and/or predators by sensing cues like allelochemicals (kairomones...) which induce alterations in the prey of numerous traits (avoidance behavior, morphological changes, changes in oviposition site etc.) allowing to reduce the cost of infection (see a review in Dicke and Grostal 2001). For instance, Sloggett and Wisser (2002) have shown that, the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*)

produces in the presence of parasitoids winged offspring that leave the host plant to flee infected colonies. To our knowledge, no study has shown that insect larvae could enhance their immune system in response to parasitoid presence. Our study revealed that *L. botrana* larvae, either young or older, did not increase their immune defenses in the presence of parasitoids, whatever the species. This result strongly suggests that *L. botrana* larvae are not able to increase prophylactically their defense under conditions where the risk of infection is increased. Our experimental protocol allowed the larvae to perceive the parasitoid presence using different cues (visuals, chemicals or vibrations) but no direct contacts between the larvae and the parasitoid. In previous study, we reported that larvae of *L. botrana* can rapidly accelerate their development and reach maturity earlier in response to cues perceived from distance of the parasitoids (Vogelweith et al. 2013a). Such a phenotypically plastic life history shift, induced by the perception of deadly enemies in the environment, indicated that larvae are able to perceive the parasitoids before the contact between the two protagonists. The absence of response at the level of the immune system is not surprising given our previous observations in this species. Indeed, we showed that *L. botrana* larvae did not increase their concentration of haemocyte and activity of the PO-PPO system after an immune challenge with heat kill bacteria (Vogelweith et al. Unpublished data). Hence, these two results may highlight that the basal level of immune effectors is determined during the development in this species and is not able to plasticity whatever the threat meet sets.

The second hypothesis explaining the positive relationship between immune parameters and successful parasitism involves parasitoids mediate a selective response in favor of high levels of immune defense among phytophagous insects. To test this hypothesis, we followed different populations for several years to get an average index of successful parasitism in the field. During this survey, variable levels of successful parasitism were observed across years, confirming previous observation made several years earlier in the field (Moreau et al. 2010). Some of the populations suffered from strong successful parasitism whereas others less. This variation allowed us to analyze the impact of successful parasitism on the immune system of the larvae. To do this, we have measured key immune parameters of uninfected larvae, in the last year of sampling. We found variable immune parameters according to the populations sampled, a common observation in others species with a geographically variable immune system (Bryan-Walker et al. 2007; Cornet et al. 2009) (Vogelweith et al. in press). More precisely, we found that the concentration of haemocyte and the synthetic value of immune defenses positively covary with successful parasitism. Furthermore, a tendency appears when we correlated the PO activity with the parasitism

success even if it is not significant, mainly due to the low number of populations followed in this survey. These results strongly emphasized the positive correlation between high immune parameters and high parasitism success in the field. Larval immune system of *L. botrana* seems adapted to local condition in terms of response to the local parasitic pressure. This local adaptation of the immune system has already been demonstrated in several biological models (Bryan-Walker et al. 2007; Kortet et al. 2007). For instance, populations of crickets (*Gryllus integer*) subject to high risk of predation and parasitism have a greater encapsulation response than populations submitted to low predation and parasitism (Kortet et al. 2007). Due to the cost of both immunity and the infection by parasites, natural selection should optimize investments to, match local prevalence and severity of parasitic infections (Kalbe and Kurtz 2006). Consequently, natural selection should favor reduced levels of immune defense in populations subjected to low parasite pressure (Kalbe and Kurtz 2006).

In conclusion, our results suggest that patterns of covariation observed in *L. botrana* between immune defense and infection prevalence by parasitoids result from selection response rather than plastic changes in immune defenses in response to local changes in parasitoid threat. From these results is likely possible to anticipate implications about the ongoing coevolutionary dynamics between hosts and parasites genotypes in this system. In particular, plastic modulation of the immune system in response to changes in parasitic threat has the particularity to maintain the most sensitive host genotypes in the population. Such a phenomenon will have the consequence to dampen the amplitude of coevolutionary oscillations between host and parasite genotypes (Kalbe and Kurtz 2006; Sadd and Schmid-Hempel 2009; Rolff and Reynolds 2009). According to our results this is unlikely to occur in the system involving *L. botrana* and its parasitoids. Consequently, this system is expected to exhibit rapid responses to selection and be highly dynamic.

## **Acknowledgements**

We thank A. Bauer, A. Balourdet, E. Colin, C. Leroux, G. Melot, S. Motreuil, A. Munoz, D. Richy, J.-P. Troussard. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006) and from the Conseil Regional of Bourgogne. The authors declare that they have no conflict of interest. We also thank the Conseils Régionaux of Aquitaine, Languedoc-Roussillon, PACA and Rhône-Alpes. We thank the vine growers and owners of all the chateaux or wineries listed in the article who kindly allowed us to sample in their vineyards.

## References

- Barnes AI, Siva-Jothy MT (2000) Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:177-182
- Bryan-Walker K, Leung TLF, Poulin R (2007) Local adaptation of immunity against a trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology* 152 (3):687-695. doi:10.1007/s00227-007-0725-x
- Bukovinszky T, Poelman EH, Gols R, Prekatsakis G, Vet LEM, Harvey JA, Dicke M (2009) Consequences of constitutive and induced variation in plant nutritional quality for immune defence of a herbivore against parasitism. *Oecologia* 160 (2):299-308. doi:10.1007/s00442-009-1308-y
- Cerenius L, Soderhall K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198:116-126. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- Chambers MC, Schneider DS (2012) Pioneering immunology: insect style. *Curr Opin Immunol* 24 (1):10-14. doi:10.1016/j.coi.2011.11.003
- Coley PD, Bateman ML, Kursar TA (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos* 115 (2):219-228
- Corby-Harris V, Promislow DEL (2008) Host ecology shapes geographical variation for resistance to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Animal Ecology* 77 (4):768-776. doi:10.1111/j.1365-2656.2008.01399.x
- Cornet S, Biard C, Moret Y (2009) Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia* 159:257-269
- Delbac L, Lecharpentier P, Thiéry D (2010) Larval instars determination for the European Grapevine Moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Crop Protection* 29:623-630
- Dicke M, Grostal P (2001) Chemical detection of natural enemies by arthropods: An ecological perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:1-23. doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.113951
- Godin J, Maltais P, Gaudet S (2002) Head capsule width as an instar indicator for larvae of the cranberry fruitworm (Lepidoptera: Pyralidae) in southeastern New Brunswick. *Journal of Economic Entomology* 95:1308-1313

- Gonzalez G, Sorci G, Moller AP, Ninni P, Haussy C, De Lope F (1999) Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Animal Ecology* 68 (6):1225-1234. doi:10.1046/j.1365-2656.1999.00364.x
- Hairston NG, Smith FE, Slobodkin LB (1960) Community structure, population control, and competition. *American Naturalist* 94 (879):421-425. doi:10.1086/282146
- Hawkins BA, Cornell HV, Hochberg ME (1997) Predators, parasitoids and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* 78:2145-2152
- Imler JL, Bulet P (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chemical Immunology and Allergy* 86:1-21
- Kalbe M, Kurtz J (2006) Local differences in immunocompetence reflect resistance of sticklebacks against the eye fluke *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasitology* 132:105-116. doi:10.1017/s0031182005008681
- Klemola T, Klemola N, Andersson T, Ruohomaki K (2007) Does immune function influence population fluctuations and level of parasitism in the cyclic geometrid moth? *Population Ecology* 49 (2):165-178. doi:10.1007/s10144-007-0035-7
- Kortet R, Rantala MJ, Hedrick A (2007) Boldness in anti-predator behaviour and immune defence in field crickets. *Evolutionary Ecology Research* 9 (1):185-197
- Lazzaro BP, Little TJ (2009) Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364 (1513):15-26. doi:10.1098/rstb.2008.0141
- Lindstrom KM, Foufopoulos J, Parn H, Wikelski M (2004) Immunological investments reflect parasite abundance in island populations of Darwin's finches. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 271 (1547):1513-1519. doi:10.1098/rspb.2004.2752
- Little TJ, Kraaijeveld AR (2004) Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 19 (2):58-60. doi:10.1016/j.tree.2003.11.011
- Lochmiller RL, Vestey MR, Boren JC (1993) Relationship between protein nutritional-status and immunocompetence in northern Bobwhite Chicks. *Auk* 110 (3):503-510
- Marmaras VJ, Lampropoulou M (2009) Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* 21 (2):186-195. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.014

- Miller TEX (2008) Bottom-up, top-down, and within-trophic level pressures on a cactus-feeding insect. *Ecological Entomology* 33 (2):261-268. doi:10.1111/j.1365-2311.2007.00964.x
- Moreau J, Villemant C, Benrey B, Thiery D (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): The influence of region and cultivar. *Biological Control* 54 (3):300-306. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.05.019
- Moret Y (2006) 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273 (1592):1399-1405. doi:10.1098/rspb.2006.3465
- Mucklow PT, Vizoso DB, Jensen KH, Refardt D, Ebert D (2004) Variation in phenoloxidase activity and its relation to parasite resistance within and between populations of *Daphnia magna*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 271 (1544):1175-1183. doi:10.1098/rspb.2004.2707
- Panzavolta T (2007) Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. *Environmental Entomology* 36:1054-1058
- Pham LN, Schneider DS (2008) Evidence for specificity and memory in the insect innate immune response. In: Beckage NE (ed) *Insect Immunology*. Academic Press, San Diego, pp 97-127
- Reynolds JJH, White A, Sherratt JA, Boots M (2011) The population dynamical consequences of density-dependent prophylaxis. *Journal of Theoretical Biology* 288:1-8. doi:10.1016/j.jtbi.2011.07.029
- Rolff J, Reynolds SE (2009) *Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology, and Mechanisms*. Oxford University Press edn., Oxford
- Sadd BM, Schmid-Hempel P (2009) Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications* 2 (1):113-121. doi:10.1111/j.1752-4571.2008.00057.x
- Sloggett JJ, Weisser WW (2002) Parasitoids induce production of the dispersal morph of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Oikos* 98 (2):323-333. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.980213.x

- Smilanich AM, Dyer LA, Chambers JQ, Bowers MD (2009) Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecology Letters* 12 (7):612-621. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01309.x
- Thiéry D (2008) *Les ravageurs de la Vigne*. 2nd edn. Féret Bordeaux
- Thiery D, Moreau J (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia* 143 (4):548-557. doi:10.1007/s00442-005-0022-7
- Tscharntke T, Hawkins BA (2002) *Multitrophic Level Interactions*. Cambridge University Press,
- Tschirren B, Richner H (2006) Parasites shape the optimal investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273 (1595):1773-1777. doi:10.1098/rspb.2006.3524
- Vogelweith F, Dourneau M, Thiéry D, Moret Y, Moreau J. Geographical variation in parasite prevalence shapes larval immunity in the phytophagous European grapevine moth larvae. *Naturwissenschaften*, *in press*
- Vogelweith F, Moret Y, Thiery D, Moreau J (2013a) *Lobesia botrana* Larvae Develop Faster in the Presence of Parasitoids. *Plos One* 8 (8). doi:10.1371/journal.pone.0072568
- Vogelweith F, Thiery D, Moret Y, Moreau J (2013b) Immunocompetence increases with larval body size in a phytophagous moth. *Physiological Entomology* 38 (3):219-225. doi:10.1111/phen.12025
- Vogelweith F, Thiery D, Quaglietti B, Moret Y, Moreau J (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology* 25 (6):1241-1247. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01911

## ANNEXE 6

### DEFENSE STRATEGIES USED BY TWO SYMPATRIC MOTH PESTS OF VINEYARDS

VOGELWEITH, F.<sup>1</sup>, THIERY, D.<sup>2</sup>, MORET, Y.<sup>1</sup>, COLIN, E.<sup>1</sup>, MOTREUIL, S.<sup>1</sup> & MOREAU, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive, UMR 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup>INRA UMR 1065 Save, Institut des Science de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon Cedex, France

Key-words: Behavioral defense, successful parasitism, *Eupoecilia ambiguella*, *Lobesia botrana*, physical defense, physiological defense.

#### 1. INTRODUCTION

Natural enemies including parasitoids are certainly the highest biotic sources of mortality for phytophagous insect (Hawkins, Cornell & Hochberg 1997). In response, insects have evolved a set of defenses to protect themselves including behavioral, morphological, physiological and immunological barriers (Gross 1993; Greeney, Dyer & Smilanich 2012). Behavioral mechanisms constitute the first line of defense involving a wide range of behaviors (like biting, twisting, dropping...) acting to reduce the risk and effects of infections by parasitoids (Greeney, Dyer & Smilanich 2012). The second line of defenses is the insect's toughened cuticle forming an efficient protective integument over the insect's external surface (Cole 1959; Greeney, Dyer & Smilanich 2012). Once the protection of the cuticle is breached, the insect immune system has to produce a rapid and efficient response to ensure host survival to parasitism. Insect immunity is innate and relies on a suite of systemic responses including encapsulation whereby haemocytes form a multiple layered capsule around a foreign object, such as a parasitoid egg. Agglutinated haemocytes produced melanin on the surface of the capsule through the activation of the enzymes of prophenoloxidase cascade (Cerenius & Soderhall 2004; Siva-Jothy, Moret & Rolff 2005).

As stated above, there are several different barriers of defences that host could be used to prevent a deadly infection. Dewitt and Langerhans (2003) support an integrating approach of these different defenses trait to achieve a better understanding of how natural enemies generate an arsenal of defenses in his prey. Indeed, different defenses could be either negatively correlated (trait compensation) or positively correlated (trait co-specialization) (DeWitt & Langerhans 2003). If these different groups of defences are costly, it is expected

that hosts will evolve only a subset of potential defenses. The assumption that defences are costly has now some direct support (Rigby & Jokela 2000; Kraaijeveld, Ferrari & Godfray 2002; Nelson 2007; Flenner et al. 2009; Parker et al. 2011). Consequently, numerous studies have demonstrated tradeoffs between morphological and behavioral defenses (DeWitt, Robinson & Wilson 2000; Mikolajewski & Johansson 2004; Steiner & Pfeiffer 2007; Hammill, Petchey & Anholt 2010; Parker et al. 2011). Some studies have also demonstrated a trade-off between behavioral and immunological defenses (Rigby & Jokela 2000; Zylberberg, Klasing & Hahn 2013). The existence of such trade-off suggests that organisms should benefit from balancing investment in immunological and non immunological defenses, because both entails costs but serve a common function. Hence, trait compensation appears as a commonly observed response between defenses to avoid predation. In contrast, only rare studies have shown co-specialization between defenses (DeWitt, Robinson & Wilson 2000; Mikolajewski & Johansson 2004).

All of the studies devoted to test the interaction between different defensive traits focus on two barriers of defenses. However, integrating behavioral, morphological and immunological defenses in one study extends greatly our understanding of compensation and co-specialization of multiple traits (Steiner & Pfeiffer 2007). Considering immunological defenses and non immunological in the same time is necessary to highlight the adaptation of hosts to their natural enemies and to our knowledge less studies has been designed to test this (Rigby & Jokela 2000; Zylberberg, Klasing & Hahn 2013). In order to get a complete picture of how defensives traits are related, comparing closely related species sharing the same environment (same ecological niche and trophic resources) is useful to evaluate the environmental influence on defensive traits (Mikolajewski & Johansson 2004) and to allow a beginning of generalization on insect defenses (Greeney, Dyer & Smilanich 2012).

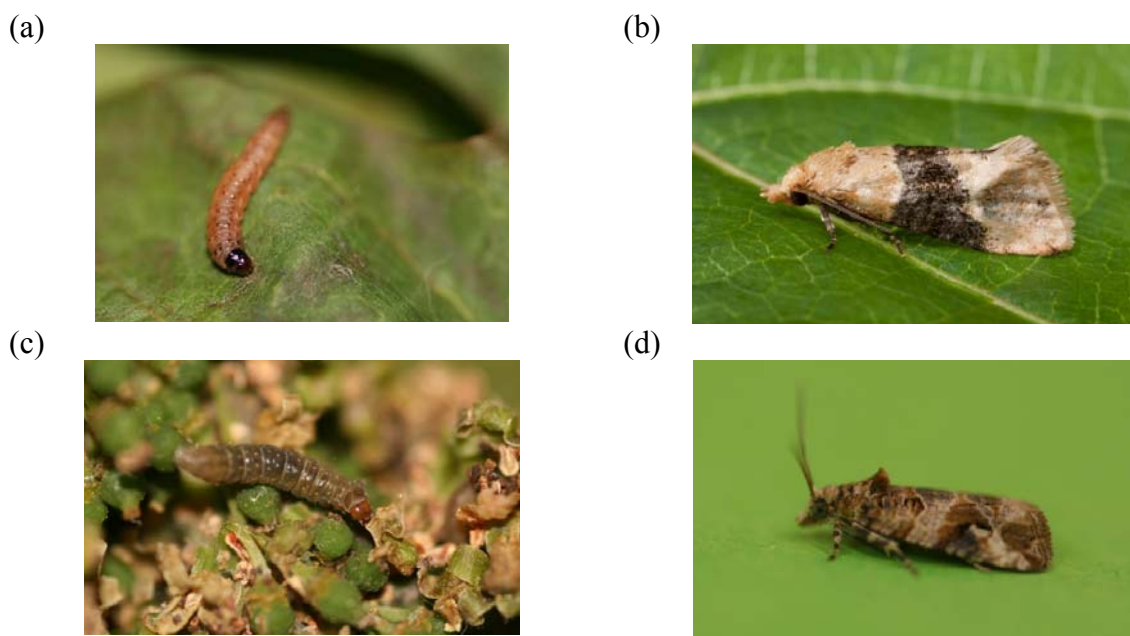
The two sympatric grapevine moths tested in this study are *Eupoecilia ambiguella* and *Lobesia botrana* (Lepidoptera, Tortricidae). These two major grapes pests in Europe are ideal candidates to test how defensive traits are related. They occur simultaneously in septentrional vineyards with intermediate hygrometry (dry conditions being a lethal factor of *E. ambiguella* eggs). They share the same parasite range made of few key parasitoids of host eggs or larvae (Thiéry 2008). In this study, we first characterized the relative investment in behavioral, physical and immunological defense systems of laboratory strains of both species of Tortricidae. Such a characterization of the relative investment of both insect species in these defenses systems was then further examined using wild caught insects occurring in a common vineyard. At the same time, parasitism success by parasitoids was estimated in both species

population to infer about the relative success of the strategy of investment between behavioral, physical and immunological defense systems used by each moth species.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### (a) Insect models and experimental designs

The grapevine moth, *E. ambiguella* (Fig. 1a and 1b) and *L. botrana* (Fig. 1c and 1d) (Lepidoptera, Tortricidae), are two of the major grapes pests in Europe due to its wide geographical distribution and the damage it may cause to bunches (Thiéry 2008). In Europe, depending on the region, *E. ambiguella* completes 2–3 broods a year and *L. botrana* 3–4. The first generation of eggs is laid in spring on the flower buds and then young larvae bore into the flower bud (called glomerulae). The second generation emerges at the end of June–July and the third generation occurs between mid-August and the end of September. Larvae are polyphagous and can develop on almost all cultivars of grapes and other plant species (Thiéry & Moreau 2005a; Thiéry 2008).



**Figure 1:** (a) Fully grown (5<sup>th</sup> instar) larva of wild European Grape Berry Moth (*Eupoecilia ambiguella*) (Picture F. Vogelweith) and (b) adult female of our strain (Picture P. Goetgeluck & D. Thiéry); (c) fully grown (5<sup>th</sup> instar) larva of wild European Grapevine Moth (*Lobesia botrana*) (Picture F. Vogelweith) and (d) wild adult female (Picture F. Vogelweith). Larva length is *ca.* 1 cm.

Laboratory strains of *E. ambiguella* (*E.a.*) and *L. botrana* (*L.b.*) used in this study came from an inbred stock kept at the INRA of Bordeaux (France). For each species, larvae were cultured in groups and maintained under standard laboratory conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm$

10% r.h., photoperiod: L16:D8) with *ad libitum* supply of a semi-artificial diet (1000 ml water, 15 g agar, 84.63 g maize flour, 41.25 g wheat germ, 45.48 g yeast, 6.03 g ascorbic acid, 0.32 g Scala<sup>®</sup>, 3.35 g mineral salt, 5 ml ethanol, 2.65 g benzoic acid and 2.76 g Nipagine) (Thiery and Moreau 2005b). The study used a total of 502 *E.a.* and 433 *L.b.* newly hatched larvae (age < 24 h) that were individually reared in centrifuge tubes filled with 1.5 mL of semi-artificial diet, which is enough for the larvae to complete development (Thiery & Moreau 2005). Lids of the tubes were pierced with a needle to allow air circulation. Larvae were maintained until they had reached the 5<sup>th</sup> larval instars. We used 5<sup>th</sup> instar larvae to assess one of the different defenses barriers (physical, behavioral or physiological).

Wild caught larvae of *L.b.* and *E.a.* were collected on Cabernet Franc in the vineyard Château Brillette (Aquitaine, France) in May 2012. We sampled larvae at the end of larval development (5<sup>th</sup> instar) from the first generation in young flower buds. Collections were not destructive, only silk nests with larvae inside were removed from the bunch. Larvae were maintained in small polyethylene boxes (60 × 40 × 21.4 cm) and fed *ad libitum* on bunches collected in the same locality, at 24 ± 1°C, 60 ± 10% RH and under the ambient photoperiod conditions until their experimental use. Larvae were then screened under binocular microscope to estimate parasitism rate and parasitism success. Parasitism rate was estimated by recording the presence of parasitoid sting (little melanotic patches) on the body surface of larvae and calculated as the number of larvae harboring parasitoid stings over the number of larvae screened. Hence, the parasitism rate allowed us to assess the efficacy of the two behavioral and morphological defense barriers. Parasitism success was estimated by keeping larvae individually in little plastic jars (30 mm × 30 mm diameter) pierced with a needle to allow air circulation, with their glom silk nest and cotton soaked in water. Larvae were checked daily until pupation, upon which chrysalis were carefully removed from the flower buds and placed individually in glass tubes (70 × 9 mm diameter) stopper with cotton plugs, and stored under standard laboratory conditions (see above). Chrysalises were daily checked for adult emergence. Parasitism success was calculated as the number of parasitoids/(number of adult *L. botrana* + number of parasitoids emerged)) and should be relevant of the efficacy of immunological defenses.

In addition, uninfected larvae from both species collected in the field (without parasitoid sting on their cuticle) were used to characterize levels of investment in behavioral, physical and immunological defenses as above described using laboratory strains.

## **(b) Behavioral defenses**

We focused on three defense behaviors currently used by moth larvae to escape predators or parasitoids. First, we considered the ability of larvae to flee from one place to another by measuring their speed (here after ‘flee’). To this end, each larva was placed in a horizontal arena made of a grid plastic sheet (84 cm × 116 cm) and acclimated for 15 sec under a cap of a 50 ml Falcon tube. After removing the cap, the number of lines crossed by the larvae was recorded for 90 sec, minimum time required for a larva to exit the arena, estimated in preliminary experiments.

The second defense behavior corresponds to the ability of larvae to repeatedly and rapidly twist (here after ‘twisting’ defense) themselves in response to a stimulation mimicking a parasitoid sting (Greeney, Dyer & Smilanich 2012). Each larva was placed on a plastic sheet (21 cm × 29.7 cm). After 15 sec of acclimation under a Falcon tube cap, larvae was touched dorsally with a fine brush once every 15 sec for 60 sec. The entire sequence was filmed (JCV Everio GZ-MG21E). The larvae response was quantified by measuring the number of twists (wave motion characterized by twists shaped "S") on the videos. Thus, an average number of twists per larva were calculated.

The third defense behavior considered was an escape behavior in which larvae drop and spin a silk yarn to land on another grape (here after ‘dropping’ defense). The length of silk thread determines the distance at which larvae can escape this way. Larvae were placed on a gallows with a height of 50 cm. Each larva was touched dorsally with a fine brush to drop the device. The yarn length woven by larvae was measured with a ruler (precision  $\pm 0.5$  mm). The number of touches required to induce the escape behavior was recorded too.

## **(c) Physical defenses**

In this study, we focus on the mechanical resistance and thickness of the integument since its hardness act as a mechanical resistance to parasitoid punctures. Mechanical resistance of the integument was quantified using a penetrometry method. Larvae of both species were sacrificed in ethanol one hour before the measurements. Larvae were attached with double-sided tape to a polystyrene board (30 × 40 mm) placed on a precision scale (precision  $\pm 0.1$  mg). A steel needle set to a drill press was moved down slowly against the integument until it touched and then penetrated it. The value given by the scale when the needle disrupted the integument indicated the physical pressure required to breach the integument as a measurement of its mechanical resistance. Measurements could only be

performed once per larvae because of their small size (head capsule width: maximum 1.3 mm).

Measurements of the integument thickness occurred immediately after those of the mechanical resistance. Larvae were removed from the polystyrene board, dissected to isolate the integument (dorsal and ventral part). The integument thickness was measured using a pressure-sensitive spessimeter (Teclock SM-112, Alpa SpA, Milano, Italy, precision  $\pm 0.01$  mm). Two measures were performed at different spots of the integument per larvae, and the mean value of both measures was used as data point per larva.

#### **(d) Immune defenses**

Levels of investment in the immune system was done by measuring the concentration of circulating haemocytes, the enzymatic activity of the prophenoloxidase (PPO) (Marmaras and Lampropoulou) system and levels of antimicrobial activity from individual samples of haemolymph.

A first group of larvae from both species was used to estimate all the three immune parameters from large individual sample of haemolymph when larvae were immunologically naïve to provide an indication about the base levels of these immune parameters. To this end, larvae were chilled on ice for 20 min, then a 2  $\mu$ l sample of haemolymph was collected in a sterile glass capillary (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from a wound made in the posterior part of the ventral side of the abdomen. One  $\mu$ l of the haemolymph sample was transferred to a microcentrifuge tube containing 25  $\mu$ l of cold sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer (0.01M sodium cacodylate; 0.005M  $\text{CaCl}_2$ ; pH 6.5), and a 10  $\mu$ l sample of this solution was immediately removed for measurement of the concentration of haemocytes using a Neubauer Improved Haemocytometer under phase contrast microscope (magnification x400). The remaining haemolymph solution was stored at  $-27^\circ\text{C}$  for later measurement of the PPO system. The remaining 1  $\mu$ l of haemolymph in the capillary was then flushed into a microcentrifuge tube internally coated with n-phenylthiourea (Sigma P7629, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 2  $\mu$ l of cold sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer and then stored at  $-27^\circ\text{C}$  for later measurement of its antibacterial activity.

The second group of larvae provides measurements on the concentration of haemocytes and activity of the PPO system only when they were immunologically naïve and 24 hours after an immune challenge mimicking a bacterial infection to estimate the amplitude of the immune response in each species (Vogelweith et al. 2013b). Larvae were chilled on ice for 20 min, and only 1  $\mu$ l of haemolymph was collected and flushed into a micro-centrifuge

tube containing 20  $\mu$ l of cold sodium cacodylate/ $\text{CaCl}_2$  buffer to measure the haemocytes count and activity of the PPO system when unchallenged. Then they were immediately immune-challenged with a sterile needle dipped into a concentrated suspension of heat-killed *Arthrobacter globiformis* (about  $10^9$  cells.ml<sup>-1</sup>) obtained from the Pasteur institute (CIP 105365) to mimic a bacterial infection. The culture of this bacterium was performed as described in Vogelweith *et al.* (2011). Larvae were then individually kept 24 hours in micro-centrifuge tube with *ad libitum* food under standard conditions. A second 1  $\mu$ l sample of haemolymph was then collected to measure the concentration of haemocytes and activity of the PPO system of each individual upon immune challenge. Since our purpose was to compare immune activity after an experimental infection across species, controlling for the effects of wounding was not necessary.

Activity of the PPO system was estimated through the measurement of the enzymatic activity of naturally activated PO enzymes (hereafter ‘PO activity’), and the activity of the proenzymes (PPO) together with that of PO (hereafter ‘total-PO activity’) using a spectrophotometric assay following the method described in Vogelweith *et al.* (2011). Antimicrobial activity in of the haemolymph was measured using a zone of inhibition assay as described in Vogelweith *et al.* (2011).

### **(g) Statistical analyses**

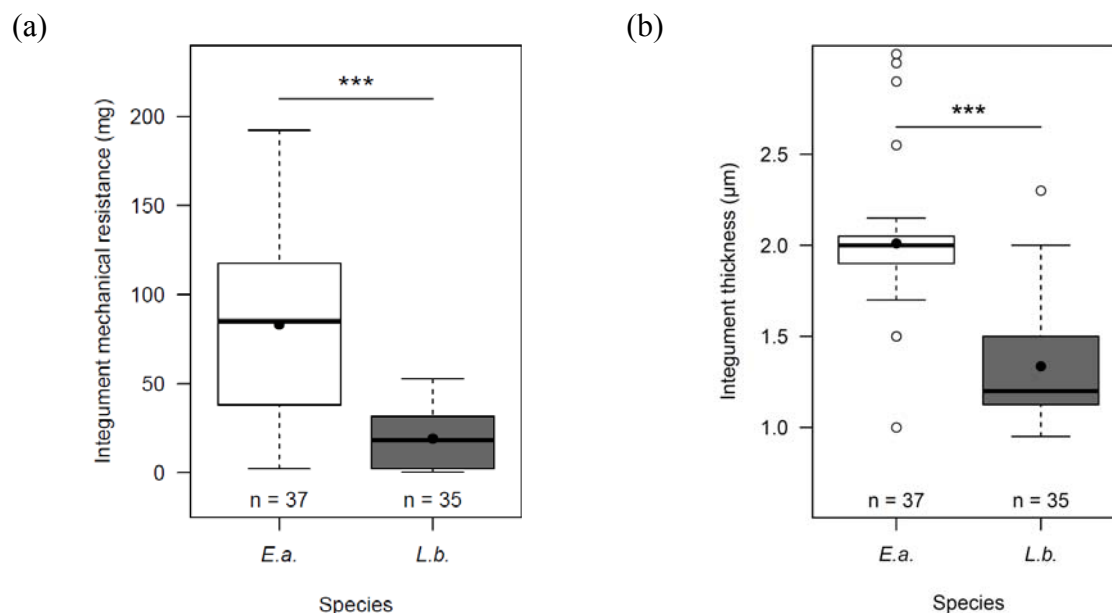
To test species effect on behavioral defenses (flee, dropping and twisting), physical defenses (mechanical resistance and thickness of the integument) and basal immunity (haemocyte count, PO and total-PO enzyme and antimicrobial activity), we used Mann-Whitney Wilcoxon test, because of non-normal distribution of data (Shapiro–Wilk and Bartlett's test).

Changes in the haemocyte count, PO and total-PO activities after a bacterial immune challenge were analyzed using analyses of variance for repeated measures (repeated ANOVA) with the immune challenge as within subject factor and species as covariate. The assumption for parametric tests was ensured by the natural-log transformations of immune parameters. Finally, we used Pearson  $\chi^2$  tests for difference in parasitism measures (parasitism rate and successful parasitism) between species. All statistical tests were performed using the R 2.15.0 (R Development Core Team 2012) software. In all the comparisons, the level of significance was  $\alpha = 0.05$ .

### 3. RESULTS

#### Physical defenses

Rearing insect lines, mechanical resistance (Fig. 2a) and thickness of the integument of larvae (Fig. 2b) were higher in *E.a.* than in *L.b.* (Table 1). In wild caught larvae, the integument of *E.a.* was more resistant than this of *L.b.* but the thickness of their integument was similar (Table 1).



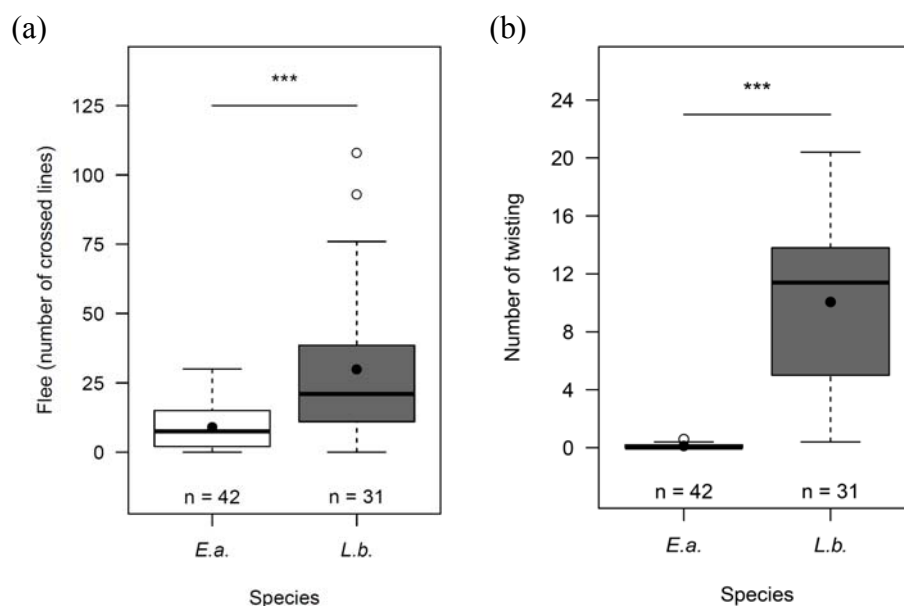
**Figure 2:** Physical defenses (a) integument mechanical resistance (mg) and (b) integument thickness (μm) in the different species, *E. ambigua* (*E.a.*; white) and *L. botrana* (*L.b.*; grey). The edges of the rectangles represent the first and third quartiles; the central features, the medians; maxima and minima by dashed lines; black circles, the means and white circle, the outliers. The “\*\*\*” means that the difference is highly significant ( $p \leq 0.0001$ ). The number “n” of larvae tested on each species appears above the x-axis.

**Table 1:** Results of species effect on the different measures realized. <sup>a</sup> Mann-Whitney Wilcoxon test, <sup>b</sup> Wilcoxon signed rank test and <sup>c</sup> Pearson  $\chi^2$  tests. Values  $p \leq 0.05$  are given in bold.

| Measures <sub>df</sub>                                            | Rearing lines |                    | Wild lines    |                    |
|-------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
|                                                                   | Test value    | p                  | Test value    | P                  |
| <b>Physical defenses</b>                                          |               |                    |               |                    |
| <i>Mechanical integument resistance</i> <sub>1</sub> <sup>a</sup> | <b>21.81</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>18.01</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> |
| <i>Integument thickness</i> <sub>1</sub> <sup>a</sup>             | <b>38.02</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> | 1.95          | 0.16               |
| <b>Behavioral defenses</b>                                        |               |                    |               |                    |
| <i>Flee</i> <sub>1</sub> <sup>a</sup>                             | <b>15.1</b>   | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>20.92</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> |
| <i>Dropping</i> <sub>1</sub> <sup>a</sup>                         | <b>43.37</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>5.19</b>   | <b>0.02</b>        |
| <i>Twisting</i> <sub>1</sub> <sup>a</sup>                         | <b>54.3</b>   | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>20.73</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> |
| <b>Physiological defenses: immune parameters</b>                  |               |                    |               |                    |
| <i>Basal immunity</i> <sup>a</sup>                                |               |                    |               |                    |
| Haemocyte count <sub>1</sub>                                      | 3.66          | 0.055              | 2.79          | 0.09               |
| PO enzyme <sub>1</sub>                                            | <b>10.14</b>  | <b>0.001</b>       | <b>16.13</b>  | <b>0.0001</b>      |
| Total-PO enzyme <sub>1</sub>                                      | <b>30.5</b>   | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>12.34</b>  | <b>0.0004</b>      |
| Antimicrobial activity <sub>1</sub>                               | 2.45          | 0.11               | 0.18          | 0.67               |
| <i>Immune challenge</i> <sup>b</sup>                              |               |                    |               |                    |
| Haemocyte count <sub>35</sub>                                     | <i>E.a.</i>   | <b>3.78</b>        | <b>0.0003</b> | -                  |
| Haemocyte count <sub>19</sub>                                     | <i>L.b.</i>   | -0.86              | 0.80          | -                  |
| PO enzyme <sub>35</sub>                                           | <i>E.a.</i>   | <b>1.74</b>        | <b>0.045</b>  | -                  |
| PO enzyme <sub>19</sub>                                           | <i>L.b.</i>   | 0.88               | 0.19          | -                  |
| Total-PO enzyme <sub>35</sub>                                     | <i>E.a.</i>   | 0.85               | 0.19          | -                  |
| Total-PO enzyme <sub>19</sub>                                     | <i>L.b.</i>   | -1.00              | 0.83          | -                  |
| <b>Parasitism measures</b>                                        |               |                    |               |                    |
| <i>Parasitism rate</i> <sub>1</sub> <sup>c</sup>                  | -             | -                  | <b>21.48</b>  | <b>&lt; 0.0001</b> |
| <i>Parasitism success</i> <sub>1</sub> <sup>c</sup>               | -             | -                  | <b>5.92</b>   | <b>0.015</b>       |

### Behavioral defenses

Except for the number of touches, all behavioral defenses measured are influenced by insect species, whatever they were rearing lines or wild caught larvae (Table 1). The number of lines crossed (Fig 3a), the number of twisting (Fig. 3b) and the length of the silk yarn performed per larvae were larger in *L.b.* than *E.a.* The number of touches required to induce a dropping defense behaviour was higher in *E.a.* than in *L.b.* (Table 1), only in laboratory strains.

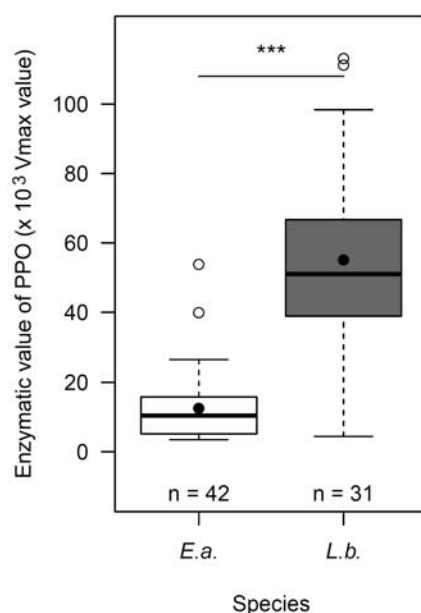


**Figure 3:** Behavioral defenses (a) flee (number of lines crossed) and (b) twisting in the different species, *E. ambiguella* (*E.a.*; white) and *L. botrana* (*L.b.*; grey) from rearing and wild lines. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles; the central features, the medians; maxima and minima by dashed lines; black circles, the means and white circle, the outliers. The “\*\*\*” means that the difference is highly significant ( $p \leq 0.0001$ ). The number “n” of larvae tested on each species appears above the x-axis.

## Immune defenses

### Basal immunity

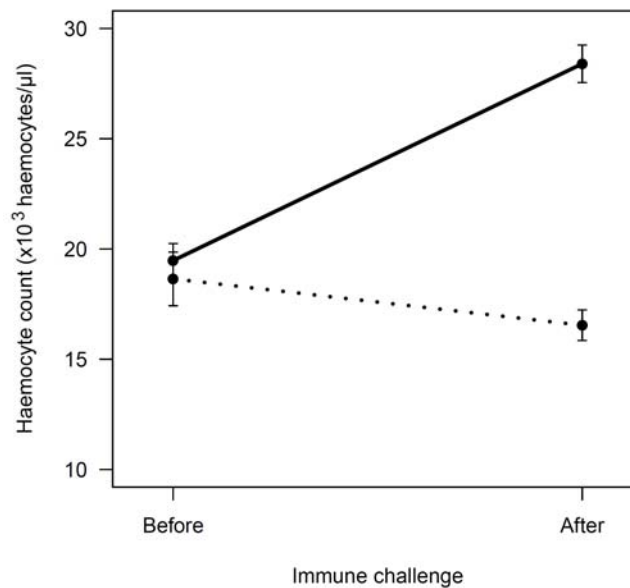
Haemocyte count and antimicrobial activity were not different between insect species whatever larvae were from rearing or wild lines (Table 1). *L.b.* larvae had an average of 13758 haemocytes/ $\mu\text{l}$  ( $\pm 957$  haemocytes/ $\mu\text{l}$ ) of haemolymph whereas *E.a.* had an average 19106 haemocytes/ $\mu\text{l}$  of haemolymph ( $\pm 1796$  haemocytes/ $\mu\text{l}$ ). The mean diameter of the zone of inhibition was 1.52 mm ( $\pm 0.66$  mm) in *L.b.* larvae and 4.07 mm ( $\pm 1.17$  mm) in *E.a.* larvae. However, PO and total-PO enzyme activities were larger in *L.b.* larvae than in *E.a.* larvae either in laboratory strains or wild caught insects (Table 1; Fig.4).



**Figure 4:** Basal immunity – enzymatic value of PPO enzyme ( $\times 10^3 V_{\max}$  value) in the different species, *E. ambiguella* (*E.a.*; white) and *L. botrana* (*L.b.*; grey) from rearing and wild lines. The edges of the rectangles represent the first and third quartiles; the central features, the medians; maxima and minima by dashed lines; black circles, the means and white circle, the outliers. The “\*\*\*” means that the difference is highly significant ( $p \leq 0.0001$ ). The number “n” of larvae tested on each species appears above the x-axis.

### Immune challenge

No change was observed in larvae of *L.b* whatever the immune effectors considered (haemocyte concentration, PO and total-PO enzyme activities). In contrast, haemocyte count and PO activity increased significantly after the immune challenge in *E.a.* larvae (Table 1-2; Fig. 5). However, there was no significant effect of the immune challenge on total-PO enzyme activity in *E.a.* larvae (Table 1-2).



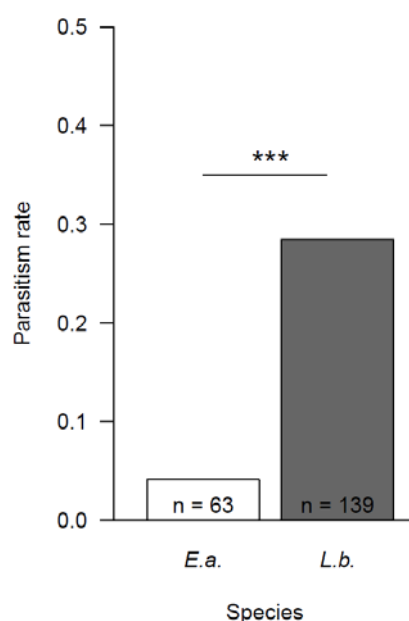
**Figure 5:** Variation in haemocyte count ( $\times 10^3$  haemocytes/ $\mu\text{l}$ ) before and after an immune challenge with heat-killed bacteria (*A. globiformis*), in *E. ambigua* (*E.a.*; solid line) and *L. botrana* (*L.b.*; dotted line). Black circles represent the mean with standard error. A total of 36 *E.a.* larvae and 20 *L.b.* larvae were tested for this immune challenge.

**Table 1.** Results of the analysis for repeated measures of haemocyte count, PO and total-PO activities. Values  $P \leq 0.05$  are given in bold.

|                  | Haemocyte count |              | PO activity  |                    | Total-PO activity |                    |
|------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Source           | $F_{1, 53}$     | $p$          | $F_{1, 53}$  | $p$                | $F_{1, 53}$       | $P$                |
| Between subjects |                 |              |              |                    |                   |                    |
| Species          | <b>7.56</b>     | <b>0.008</b> | <b>69.45</b> | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>344.58</b>     | <b>&lt; 0.0001</b> |
| Within subjects  |                 |              |              |                    |                   |                    |
| Time             | 1.68            | 0.20         | 1.91         | 0.17               | 0.02              | 0.87               |
| Time*Species     | <b>7.97</b>     | <b>0.007</b> | 0.33         | 0.57               | 1.82              | 0.18               |

### Parasitism measures

Larvae of both moth species differed in their rate of parasitism and parasitism success measures (Table 1). A total of 28.5% of *L.b.* larvae harbored sting patches on their cuticles whereas only 4.1% of *E.a.* larvae did (Table 1; Fig. 6). Furthermore, parasitism by parasitoids was more successful in *L.b.* than in *E.a.* In fact, no parasitoids successfully developed in *E.a.* (Table 1; Fig 6).



**Figure 6:** Parasitism rate – Rate of larvae with sting in the different species, *E. ambiguella* (*E.a.*; white) and *L. botrana* (*L.b.*; grey). The “\*\*\*\*” means that the difference is highly significant ( $p \leq 0.0001$ ). The number “n” of larvae tested on each species appears above the x-axis.

#### 4. DISCUSSION

When facing parasitoids, insect larvae protect themselves with a diverse suite of defence systems. In this study, we compared the relative investment into behavioral, physical and immunological defense systems of two related grapevine moth *E. ambiguella* and *L. botrana*. We clearly demonstrated that larvae of these two species exhibit different pattern of investment into these defense systems. *E. ambiguella* larvae invest more into morphological defenses (more resistant and thicker integument) and less in behavioral defenses (low performance in flee, twisting and dropping defenses) than *L. botrana*. In addition, *L. botrana* larvae exhibit higher basal levels of immune defenses (PO and PPO activity) than larvae *E. ambiguella*. However, larvae *E. ambiguella* respond to an immune challenge by increasing immune parameters whereas larvae *L. botrana* seems not to have the capacity to raise their immune effectors following a bacterial challenge. Finally, in natural population, *L. botrana* larvae are more parasitized by different species of parasitoid than *E. ambiguella* suggesting that efficacy against parasitoids are not equal between different species.

A major result of this study is that the two sympatric species have not developed a complete suite of defenses. As predicted by optimal defense theory, resources allocated to different defense systems should be partitioned with others fitness traits. For example, individual investing in defenses should reduced investment in fecundity (Gwynn et al. 2005).

Moreover, all defenses involved against natural enemies are energetically costly and larvae cannot invest in all of these defenses. We clearly observed a differential investment in several defense systems depending on the insect species. *L. botrana* have developed behavioral and basal immunity components whereas *E. ambiguella* favored morphological and immune responsiveness to immune insults. Therefore, our results suggest that tortricid moth shows a set of trait co-specialization and trait compensation according to the classification of DeWitt et al. (2000). Our results are consistent with the general observation that morphological defenses are negatively traded-off with behavioral defenses in these two closely related moth (DeWitt, Robinson & Wilson 2000; Mikolajewski & Johansson 2004; Steiner & Pfeiffer 2007; Hammill, Petchey & Anholt 2010; Parker et al. 2011; Lefevre et al. 2012). Indeed, the insect species with stronger morphological defenses also has poor behavioral defenses against parasitoids. We also found clear trade-offs between immunological defenses across species. *L. botrana* larvae have larger basal activity of the prophenoloxidase system than *E. ambiguella*, whereas the latter are able to mount stronger and faster immune responses to bacterial challenge, involving an increased number of circulating haemocytes (probably released from the hematopoietic organ and/or by continued division of circulating haemocytes (Lavine and Strand 2002) and PO activity, than *L. botrana*. The comparison of the immune system of this two related species highlights two different strategies selected by natural enemies. One species (*L. botrana*) have a constitutive defense ready to respond to an attack whereas the other (*E. ambiguella*) have a low basal immunity but are capable of rapid mobilization of the different immune effectors necessary to combat an infection. Differential selective pressure imposed by parasitoid in vineyards may explain why such a co-occurrence of different defense strategies between two related species. From our field sampling, we found that *L. botrana* larvae were more parasitized than *E. ambiguella*. Indeed, around 30% of *L. botrana* collected larvae harbored sting patches on their cuticles whereas they were found in only 4% of larvae of *E. ambiguella*. Maintaining high levels of investment to immune defences is costly and then individuals show reduced expression of other important life history traits (Lochmiller & Deerenberg 2000). In the absence of selective pressure by parasites, we expected a reduction of basal investment as observed in *E. ambiguella*. *L. botrana* could not respond to the immune challenge because its base level of immune defenses was already high. Our study shows the importance to integrate several defensive traits (behavioral, morphological and immunological) to understand how defensive traits have coevolved during the process of natural selection.

These two sympatric species live in the same habitat, and even if these two species use oviposition deterring kairomones (Thiery & Gabel 1993), larvae sometimes share the same bunches and can be targeted by the same natural enemies. Despite these similarities, *L. botrana* were found more parasitized by parasitoid than *E. ambiguella*. This strongly suggests that the pattern of defensive traits harbored by *E. ambiguella* is more efficient against parasitoids than this of *L. botrana*. While our experiment was not designed to assess precisely the relative contributions of behavioral, morphological and immunological traits to the risk of being parasitized, it still allowed us to make some inferences. As *E. ambiguella* larva has a thick skin but moves slightly and slowly, we could conclude that a thick skin is a better protection to prevent parasitoid sting than an active behavior. Previous studies have already shown that parasitoid oviposition could be more difficult against older larvae because of thicker cuticles (Beckage & Riddiford 1978). Most parasitoids wasps contact their hosts to sting them and thus ovipositing inside the body and behavior of host like spiting and biting could act as an efficiency mechanism to prevent parasitoid oviposition (Potting, Vermeulen & Conlong 1999). In addition, the low activity reduces the risk of *E. ambiguella* being detected by a searching parasitoid (Cressler, King & Werner 2010). Indeed, many parasitoids use visual signals to find their hosts (Vinson 1976). However, we did not assess the chemical cue during this study, thus it still remains the possibility that parasitoid could chemically detect easier larvae of *L. botrana* than *E. ambiguella* in grapes. Indeed, the chemical cues of their host or from their frass are very important for parasitoid to detect their host (Mattiacci & Dicke 1995; Chucho, Xuereb & Thiery 2006). Secondly, among the few proportion of *E. ambiguella* larvae in which sting was detected, no adult parasitoid emerged from *E. ambiguella* larvae suggesting that physiological defenses are more efficient in this species than *L. botrana*. Haemocytes and the PO enzyme cascade (PPO and PO activity) are the frontline of immune defense against parasites entering the insect haemocoel (Lavine & Strand 2002; Cerenius & Soderhall 2004; Haine et al. 2008). Haemocytes are certainly the most important functional elements involved in the recognition and encapsulation of pathogens (Lavine & Strand 2002; Cerenius & Soderhall 2004; Haine et al. 2008). The ability of insects to rapidly mobilize enzymes of the PO cascade and haemocytes upon an immune challenge was shown to be associated to the ability to encapsulate parasitoid eggs, as previously shown in *Drosophila* (Eslin & Prevost 1996; Eslin & Prevost 1998; Jiang, Vilcinskas & Kanost 2010). Therefore, we may hypothesize that *E. ambiguella* present an increased ability to withstand attacks by pathogens during their larval lifetime than *L. botrana*. The absence of emerged parasitoid from *E. ambiguella* pupae comforts this hypothesis. Clearly a functional

studies like Van Buskirk and Mccollum (2000) could help knowing which defensive traits are directly connected to avoidance of parasitoids.

Lepidopteran larvae are the target of rather numerous natural enemies in the field including parasitoids, predators (insects, birds, bats ...) and pathogens (Hawkins, Cornell & Hochberg 1997; Kalka, Smith & Kalko 2008). All this natural enemies have the potential to select in their prey a different range of defenses acting before, during and after an attack. Therefore, it is rather impossible to discern which kind of defensive traits function as defenses against parasitoid or predators and thus which natural enemies are actually selected particular defensive traits. However, previous works have found that some defensive mechanisms are orientated against predators and other against parasitoids (Gentry & Dyer 2002; Barbosa & Caldas 2007; Smilanich et al. 2009). In addition, many defensive traits could be effective against predators and at the same time and ineffective against parasitoids (Gross 1993 and references therein). Recently a study performed by Smilanich et al. (2009) argued that immune response is one of the most important defenses against parasitoid that Lepidopteran larvae have rather behavioral traits. The assumption behind this statement is the finding that the immune response was the best predictor of parasitism compared to other defensive traits in the field (Gentry & Dyer 2002; Barbosa & Caldas 2007; Smilanich et al. 2009). In our study, *E. ambiguella* with higher immunity and morphological defenses harbor fewer stings and is less parasitized than *L. botrana*, which exhibited stronger morphological defenses. Therefore, our result seems to be in accordance with the conclusion of Smilanich and collaborators (2009) about the importance of immune system against parasitoid.

Finally, results of this study could have implications for the management of biological control program against these two species. *L. botrana* and *E. ambiguella* are two of the major grapes pests in Europe. Vineyards are mainly treated with pesticides but biological control is a possible future strategy against these pests since different species of parasitoids are known on *L. botrana* and *E. ambiguella* in vineyards (Thiéry et al. 2001; Xuéreb & Thiéry 2006; Thiéry 2008; Thiéry et al. 2011). Here we show that defenses differ between two species thus both species may not suffer the same parasitoid pressure. As efficient defenses affect the success of parasitoids used in classical biological control, host defenses may have influenced the establishment of the control. These results support that resistance to parasitoids may differ in these two species and this could account for their spatial distribution. An applied perspective in biological control could consist in releasing amounts of parasitoids. More parasitoids should be used to control *E. ambiguella* as compared to *L. botrana*. This has however never been tested yet. Hence, we could hypothesize that *E. ambiguella* are less

amenable to biological control than *L. botrana*. From the results of our study, it is clear that in order to implement a successful biological control program against tortricid moths, more information are needed on defensive traits and their efficiency against parasitoid. Perform a choice experiment, offering *E. ambiguella* and *L. botrana* to a female parasitoid, will permit us to know which species is preferred by parasitoids, when they lived in sympatry. If the female parasitoids prefer *L. botrana*, it would be difficult to control the *E. ambiguella* populations. More generally, we point out as already done by other authors (Dyer & Gentry 1999) that there is considerable underutilization of current knowledge in ecological theory to implement successful biological control program.

### Acknowledgments

We thank Lionel Delbac, Morgane Dourneau, Geoffrey Melot, Karen Muller and Alicia Munoz. This study was supported by the CNRS and grants from the ANR (ANR-07-JCJC-0134 and ANR-08-JCJC-0006). We also thank the Conseils Régionaux of Aquitaine and Bourgogne.

### References

- Barbosa, P. and Caldas, A.** 2007. Do larvae of species in macrolepidopteran assemblages share traits that influence susceptibility to parasitism? *Environmental Entomology*, **36**, 329-336.
- Beckage, N. E. and Riddiford, L. M.** 1978. Developmental interactions between the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its braconid parasite, *Apanteles congregatus*. . *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **23**, 139-151.
- Cerenius, L. and Soderhall, K.** 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, 116-126.
- Chuche, J., Xuereb, A. and Thiery, D.** 2006. Attraction of *Dibrachys cavus* (Hymenoptera : Pteromalidae) to its host frass volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, **32**, 2721-2731.
- Cole, L. R.** 1959. On the defences of lepidopterous pupae in relation to the oviposition behaviour of certain Ichneumonidae. *Journal of the Lepidopterist's Society*, **13**, 1-10.
- Cressler, C. E., King, A. A. and Werner, E. E.** 2010. Interactions between Behavioral and Life-History Trade-Offs in the Evolution of Integrated Predator-Defense Plasticity. *American Naturalist*, **176**, 276-288.
- DeWitt, T. J. and Langerhans, R. B.** 2003. Multiple prey traits, multiple predators: keys to understanding complex community dynamics. *Journal of Sea Research*, **49**, 143-155.

- DeWitt, T. J., Robinson, B. W. and Wilson, D. S.** 2000. Functional diversity among predators of a freshwater snail imposes an adaptive trade-off for shell morphology. *Evolutionary Ecology Research*, **2**, 129-148.
- Dyer, L. A. and Gentry, G.** 1999. Predicting natural-enemy responses to herbivores in natural and managed systems. *Ecological Applications*, **9**, 402-408.
- Eslin, P. and Prevost, G.** 1996. Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. *Journal of Insect Physiology*, **42**, 549-555.
- Eslin, P. and Prevost, G.** 1998. Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 807-816.
- Flenner, I., Olne, K., Suhling, F. and Sahlen, G.** 2009. Predator-induced spine length and exocuticle thickness in *Leucorrhinia dubia* (Insecta: Odonata): a simple physiological trade-off? *Ecological Entomology*, **34**, 735-740.
- Gentry, G. L. and Dyer, L. A.** 2002. On the conditional, nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology*, **83**, 3108-3119.
- Greeney, H. F., Dyer, L. A. and Smilanich, A. M.** 2012. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical, physiological, morphological, and behavioral defenses against natural enemies. *Isj-Invertebrate Survival Journal*, **9**, 7-34.
- Gross, P.** 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **38**, 251-273.
- Gwynn, D. M., Callaghan, A., Gorham, J., Walters, K. F. A. and Fellowes, M. D. E.** 2005. Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **272**, 1803-1808.
- Haine, E. R., Moret, Y., Siva-Jothy, M. T. and Rolff, J.** 2008. Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Science*, **322**, 1257-1259.
- Hammill, E., Petchey, O. L. and Anholt, B. R.** 2010. Predator Functional Response Changed by Induced Defenses in Prey. *American Naturalist*, **176**, 723-731.
- Hawkins, B. A., Cornell, H. V. and Hochberg, M. E.** 1997. Predators, parasitoids and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, **78**, 2145-2152.
- Jiang, H., Vilcinskis, A. and Kanost, M. R.** 2010. Immunity in lepidopteran insects. In: *Invertebrate Immunity* (Ed. K. Soderhall), pp. 181-204.

- Kalka, M. B., Smith, A. R. and Kalko, E. K. V.** 2008. Bats limit arthropods and herbivory in a tropical forest. *Science*, **320**, 71-71.
- Kraaijeveld, A. R., Ferrari, J. and Godfray, H. C. J.** 2002. Costs of resistance in insect-parasite and insect-parasitoid interactions. *Parasitology*, **125**, S71-S82.
- Lavine, M. D. and Strand, M. R.** 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Lefevre, T., de Roode, J. C., Kacsoh, B. Z. and Schlenke, T. A.** 2012. Defence strategies against a parasitoid wasp in *Drosophila*: fight or flight? *Biology Letters*, **8**, 230-233.
- Lochmiller, R. L. and Deerenberg, C.** 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, **88**, 87-98.
- Marmaras, V. J. and Lampropoulou, M.** 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, **21**, 186-195.
- Mattiacci, L. and Dicke, M.** 1995. Host-age discrimination during host location by *Costesia glomerata*, a larval parasitoid of *Pieris brassicae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **76**, 37-48.
- Mikolajewski, D. J. and Johansson, F.** 2004. Morphological and behavioral defenses in dragonfly larvae: trait compensation and cospecialization. *Behavioral Ecology*, **15**, 614-620.
- Nelson, E. H.** 2007. Predator avoidance behavior in the pea aphid: costs, frequency, and population consequences. *Oecologia*, **151**, 22-32.
- Parker, B. J., Barribeau, S. M., Laughton, A. M., de Roode, J. C. and Gerardo, N. M.** 2011. Non-immunological defense in an evolutionary framework. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 242-248.
- Potting, R. P. J., Vermeulen, N. E. and Conlong, D. E.** 1999. Active defence of herbivorous hosts against parasitism: Adult parasitoid mortality risk involved in attacking a concealed stem-boring host. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **91**, 143-148.
- Rigby, M. C. and Jokela, J.** 2000. Predator avoidance and immune defence: costs and trade-offs in snails. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **267**, 171-176.
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y. and Rolff, J.** 2005. Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. In: *Advances in Insect Physiology*, Vol 32 (Ed. S. J. Simpson), pp. 1-48.
- Smilanich, A. M., Dyer, L. A., Chambers, J. Q. and Bowers, M. D.** 2009. Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecology Letters*, **12**, 612-621.

- Steiner, U. K. and Pfeiffer, T.** 2007. Optimizing time and resource allocation trade-offs for investment into morphological and behavioral defense. *American Naturalist*, **169**, 118-129.
- Thiéry, D.** 2008. *Les ravageurs de la Vigne*. 2nd edn. Bordeaux: Féret
- Thiéry, D., Delbac, L., Villemant, C. and Moreau, J.** 2011. Control of grape berry moth larvae using parasitoids: should it be developed? . *IOBC/WPRS Bulletin*, **67**, 189-196.
- Thiery, D. and Gabel, B.** 1993. Inter-specific avoidance of egg-associated semiochemicals in 4 Tortricids. *Experientia*, **49**, 998-1001.
- Thiery, D. and Moreau, J.** 2005. Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, **143**, 548-557.
- Thiéry, D., Xuéreb, A., Villemant, C., Sentenac, G., Delbac, L. and Kuntzman, P.** 2001. Les parasites de tordeuses de vignobles : aperçu de quelques espèces présentes dans 3 régions viticoles françaises. *IOBC, WOPRS Bulletin*, **27**, 135-141.
- Van Buskirk, J. and McCollum, S. A.** 2000. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology*, **203**, 2149-2158.
- Vinson, S. B.** 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **21**, 109-133.
- Vogelweith, F., Moret, Y., Thiéry, D. and Moreau, J.** 2013. *Lobesia botrana* larvae develop faster in the presence of parasitoids. *Plos One*, **8**, e72568.
- Vogelweith, F., Thiery, D., Quaglietti, B., Moret, Y. and Moreau, J.** 2011. Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecology*, **25**, 1241-1247.
- Xuéreb, A. and Thiéry, D.** 2006. Does natural larval parasitism of *Lobesia botrana* vary between years, generation, density of the host and vine cultivar ? *Bulletin of Entomological Research*, **96**, 105-110.
- Zylberberg, M., Klasing, K. C. and Hahn, T. P.** 2013. House finches (*Carpodacus mexicanus*) balance investment in behavioural and immunological defences against pathogens. *Biology Letters*, **9**.