



**HAL**  
open science

## Les problèmes de couple dans les symbioses némato-bactériennes parasites d'insecte.

Vanya Emelianoff

► **To cite this version:**

Vanya Emelianoff. Les problèmes de couple dans les symbioses némato-bactériennes parasites d'insecte.. Ecologie, Environnement. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2008. Français. NNT: . tel-00528291

**HAL Id: tel-00528291**

**<https://theses.hal.science/tel-00528291>**

Submitted on 21 Oct 2010

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

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

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Discipline : Biologie des Populations et Écologie

Formation Doctorale : Biologie de l'Évolution et Écologie

École Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences,  
Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

Vanya Emelianoff

le 1<sup>er</sup> juillet 2008

Titre :

**Les problèmes de couple dans les symbioses  
némato-bactériennes parasites d'insecte.**

JURY

Mme. CLAIRE LAVIGNE, Chargée de recherche, INRA, Avignon

Mme. CATHERINE MOULIA, Professeur, Université Montpellier II

M. FRÉDÉRIC FLEURY, Professeur, Université de Lyon

M. THIERRY RIGAUD, Directeur de recherche, CNRS, Dijon

M. OLIVER KALTZ, Chargé de recherche, CNRS, Paris

M. JEAN-BAPTISTE FERDY, Maître de conférences, Université Montpellier II

Présidente

Directrice

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur

UNIVERSITÉ MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Discipline : Biologie des Populations et Écologie

Formation Doctorale : Biologie de l'Évolution et Écologie

École Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociétés,  
Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

Vanya Emelianoff

le 1<sup>er</sup> juillet 2008

Titre :

**Les problèmes de couple dans les symbioses  
némato-bactériennes parasites d'insecte.**

JURY

Mme. CLAIRE LAVIGNE, Chargée de recherche, INRA, Avignon

Mme. CATHERINE MOULIA, Professeur, Université Montpellier II

M. FRÉDÉRIC FLEURY, Professeur, Université de Lyon

M. THIERRY RIGAUD, Directeur de recherche, CNRS, Dijon

M. OLIVER KALTZ, Chargé de recherche, CNRS, Paris

M. JEAN-BAPTISTE FERDY, Maître de conférences, Université Montpellier II

Présidente

Directrice

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur



*A Cyria*

# Laboratoire d'accueil :

Équipe Interactions

Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier

UMR 5554 (CNRS-UM2)

Bâtiment 22, 1<sup>er</sup> étage, case courrier 65

Université Montpellier 2 - Sciences et Techniques du Languedoc

Place Eugène Bataillon

34 095 Montpellier cedex 05

# Remerciements

**Jean - Baptiste**, j'hallucine. A cause de tout ce que tu m'as apporté au cours de nos quelques années de co-évolution. Merci pour tes conseils scientifiques, pédagogiques, touristiques, mécaniques, artistiques. Merci pour ton intelligence, ton efficacité, ton enthousiasme, tes rêves, ta rigueur, ton exigence, ton impatience, ta patience, ta pédagogie, ta disponibilité, ton perfectionnisme, ta générosité. Ton investissement dans la symbiose a un peu augmenté ta reproduction scientifique sans, apparemment, compromettre ta survie : un effet parental sans doute... Chouette, tu vas pouvoir te permettre de porter encore plein d'étudiants avec, je le leur souhaite, autant de dévouement et d'enthousiasme que ceux que tu m'as montrés. Je ne sais pas trop ce qui stabilise notre interaction mais j'espère qu'elle sera durable, sur le plan personnel si ce n'est professionnel, et que nos chemins se recroiseront, quelque part entre Madrid et Varsovie...

**Catherine**, merci d'avoir gardé un œil sur ce travail malgré nos centres d'intérêts différents et un emploi du temps improbable. Merci pour ton réalisme. Merci pour ta compréhension.

**Nathalie**, merci d'avoir été à mes côtés pendant ces années de manips. Tu m'as formée à toutes les expériences, aéré l'esprit avec des sujets de discussion bien éloignés des comptages qui nous occupaient, et globalement beaucoup appris. Un grand merci également pour tous les dessins qui illustrent ce manuscrit et pour ta redoutable efficacité dans la modification d'images, même avec mes requêtes affolées d'avant-veille de remise de manuscrit ! Je te souhaite bonne entrée dans la nouvelle vie que tu as choisie.

**Élodie**, camarade de galère, merci pour ton infinie patience, ta douceur, ta gentillesse. Merci de m'avoir aidée tout au long des comptages, broyages et infections, et d'avoir intégralement pris la relève. A nos partages d'états d'âme, à nos pétages de câble, à nos injections nocturnes, OK? C'est bon...

**Bernard**, merci pour ta présence et ton investissement dans mon DEA, puis dans cette thèse, pour ton soutien sans faille, pour la pertinence de tes remarques et la luminosité de tes explications. Merci pour la sensibilité dont tu as fait preuve en me rattrapant par les bretelles lors d'une mauvaise passe! Sois assuré de ma profonde gratitude et de ma plus sincère amitié.

**Isabelle**, merci de m'avoir permis de faire cette thèse. Merci pour les précieuses et éclairantes explications que tu m'as données dès le DEA et pour ta participation aux comités de thèse (et pour ton marrainage?!).

**Sylvie**, merci de m'avoir formée en bactériologie, je partais de zéro et tu as eu la patience de t'y coller, en DEA comme en thèse. Merci pour ta gentillesse, pour ta disponibilité et pour ta rigueur.

**Marc-André**, merci de m'avoir transmis ta passion de l'enseignement bien au-delà de ton statut de tuteur pédagogique, au fil des sorties naturalistes, de Timarha au CPIE de Belle-Isle en passant par le GNUM et la prépa de Lyon! Merci également pour ton investissement, en DEA, dans mon projet fictif de recherche qui m'a permis de découvrir la thématique Orchidées, que peut-être je pourrai creuser ces prochaines années en allant triturer les albinos parisiens.

**Mathieu**, mon antimatricière, merci pour ta bonne humeur, ton ouverture d'esprit, ton punch, ton efficacité et ton implication dans la plupart des articles de cette thèse.

**Thierry**, merci pour ta participation à la partie "terrain" de cette thèse et pour les fous rires qui l'ont accompagnée, pour ton dynamisme, pour la diversité de tes centres d'intérêts et pour nos sorties hors du labo. Promis je serai brave.

**François**, merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et d'avoir pimenté séminaires et comités de thèse avec tes jeux de mots!

Merci à **Serge** de m'avoir initiée à la parasitologie en DEA et pour son implication dans les comités de thèse.

Merci aux gens du bâtiment 24, notamment, pour le 1<sup>er</sup> étage, Annie, Pierre et Erick pour leur patience face à mes angoisses de novice en techniques de biologie moléculaire, Nelly pour ses conseils stratégiques, Frédérique, Stephen, Nolwenn, Ludo et Dorothy, et pour le 3<sup>e</sup> étage, Noël puis Patrick pour m'avoir auboisée à manipuler dans leur labo, Alain, Michel, Sonia, Nadège, Christine, Fabienne, Karine et Ziad pour nos discussions, scientifiques ou non.



Merci à Magali, de passage quelques mois dans le labo, et à mes stagiaires, Benjamin, Grégoire, Céline et Valérie, qui ont mis la main à la pâte et avec qui j'ai appris à encadrer des étudiants. Merci aussi aux gens du bâtiment 22, notamment Michel et Alex, qui ont gentiment assisté à une répétition de thèse.

Merci à tous les moniteurs que j'ai croisés au cours de mes enseignements et à tous les permanents qui m'ont formés à ce merveilleux métier : Sylvie H.-B., Bruno, Eric, Audrey, Cécile, Marc-André et la dream team du bâtiment 4 !

Merci à mes rapporteurs, Frédéric Fleury et Thierry Rigaud, ainsi qu'à aux autres membres du jury, Claire Lavigne et Olivier Kaltz, pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette thèse et le temps qu'ils ont consacré à son amélioration, et pour leurs questions et suggestions.

Merci à mes amis de Paris, Filou, Ving, Flob, Marianne, Pouille, Armelle, Lison, les colocos de Pipus, les cocos, Mathieu L., Seb, Valet Virginie, et à ceux de Montpellier, Audrey, Sylvain, Gentiane, Florent, Lucie, Biquette, Sandrine, Loloche, Jean-Pascal, D et Camille, Nadia, la promo Parasito 2004 et tous ceux que j'oublie, pour les bons moments passés ensemble.

Merci à tous ceux qui m'ont, plus ou moins directement, aidés à faire des choix importants, notamment Mica et Christine, à qui je dois beaucoup, mais aussi Sylvain, Audrey, Melo, Franck, Elise, Denis, Roupoil.

Merci à mon amour pour tout ce qui se passait en dehors du labo, pour son tendre soutien et pour sa patience qui lui a fait vaillamment supporter mes états d'âme parfois très fluctuants !

Merci à ma famille et à celle de Mia. Merci tout particulièrement à ma grande soeur, dédicataire de cette thèse et enseignante-chercheuse passionnée qui m'a toujours poussée, presque dès mon plus jeune âge, à tenter l'aventure d'une thèse.

Merci aux "pères fondateurs", Régis Ferrière et Pierre-Henri Gouyon, qui m'ont fait découvrir et aimer l'écologie et l'évolution.

Merci à tous les agriculteurs bio qui m'ont permis d'expérimenter dans leur jardin, pour leur curiosité scientifique et leur ouverture d'esprit.

Merci à M. Dumont, de la *Terre Dorée*, fournisseur des 17 521 chenilles à qui ce travail a coûté la vie.

Merci enfin à tous les artistes qui m'ont, sans s'en douter, vraiment aidés en m'accompagnant agréablement tout au long de ces années de manipo : J.S. Bach, S. Barber, L.v. Beethoven, Bérabai, G. Brassens, F. Chopin, E. Elgar, les Fatals Picards,

R. Garza - Fons, G. Mahler, Massive Attack, W.A. Mozart, Noir Désir, Paris Combo,  
J.-B. Pergolesi, Placebo, Radiohead, S. Rachmaninov, Renaud S., F. Schubert, D. Squibon,  
Zelada ...

*Vue d'un peu loin, une association mutualiste présente les deux caractères du ménage parfait, fidélité et bonne entente [...]*

C. Combes, *Interactions Durables*, p 466.

## Les problèmes de couple dans les symbioses nématode-bactériennes parasites d'insecte.

**Résumé :** Les nématodes entomopathogènes *Steinernema* sont associés symbiotiquement à des bactéries du genre *Xenorhabdus*. Leur cycle de vie comprend deux phases : une phase libre, dans le sol, où les nématodes portent leurs symbiotes dans le tube digestif, et une phase parasite, dans l'insecte, où les deux partenaires se multiplient côte à côte. Le bilan fin de l'interaction, globalement bénéfique pour les deux partenaires, a été peu étudié pour le moment.

Dans un premier temps, nous avons abordé ces symbioses d'un point de vue coûts-bénéfices pour le nématode afin d'identifier les pressions de sélection agissant sur son **investissement dans la symbiose**. Nous montrons que l'association est à la fois bénéfique (reproduction en phase parasitaire) et coûteuse (mortalité en phase libre) pour le nématode, en proportion de sa charge symbiotique. Ces corrélations engendrent un compromis survie-reproduction pour le nématode, médié par ses symbiotes. Selon les conditions environnementales, elles pourraient éventuellement déstabiliser l'association, et, notamment, altérer sa spécificité.

Dans un second temps, nous avons donc exploré la **spécificité** de ces associations dans la nature et au laboratoire. Lors d'un échantillonnage de terrain, nous avons retrouvé la spécificité de ces associations largement décrite par ailleurs. Au laboratoire, la réassociation expérimentale entre nématodes et bactéries non natives montre que le spectre des bactéries retenues est plus étroit que le spectre des bactéries bénéfiques. De plus, des différences de modalités d'association apparaissent entre espèces de nématodes, qui suggèrent que la correspondance nématode - bactérie ne serait pas aussi stricte que prévu.

**Mots-clés :** symbiose, mutualisme, coût, compromis, investissement, spécificité, *Steinernema*, *Xenorhabdus*.

### Relationship problems in entomopathogenic nematode-bacteria couples.

**Abstract :** Entomopathogenic nematodes from *Steinernema* genus are symbiotically associated with *Xenorhabdus* bacteria. Their life cycle comprises two phases : a free stage in the soil, where bacteria are carried inside nematodes' gut and a parasitic stage in the insect, where both partners are separated and multiply in parallel. For nematodes, benefits are clear during the parasitic stage while costs prevail during the free stage.

We first tried to measure the balance between costs and benefits in these symbioses to identify selective pressures acting on nematode's **symbiotic investment**. We showed that nematodes endure costs to the association in free stage in terms of survival, these costs increasing with bacterial load. On the other side, nematodes benefit from the symbiosis in proportion of bacterial load in parasitic stage in terms of reproduction. These two antagonistic effects lead to a trade-off between nematodes' survival and reproduction which is mediated by their bacterial symbionts. Thus, depending on the environment, these correlations could challenge association stability. It could also impact the way the specificity of these associations evolves.

In a second part, we addressed the question of **symbiosis specificity** *in natura* as well as in laboratory. Field samples confirmed the already-known constancy of association between a nematode species and a bacteria species all over the world. Experimental re-associations between two nematode species and foreign bacteria showed differences between retention and benefit specificities as well as inter-specific variability. Thus the one-to-one association between nematode and bacteria species may not be as strict as previously thought.

**Keywords :** symbiosis, mutualism, cost, trade-off, investment, specificity, *Steinernema*, *Xenorhabdus*.

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>5</b>
Contexte général	5
Modèle biologique	7
Objectifs de la thèse	16
<b>Méthodes expérimentales</b>	<b>19</b>
<b>I De l'investissement dans le couple, ou comment travailler plus sans gagner plus</b>	<b>23</b>
1 OÙ le symbiote peut s'avérer coûteux	24
2 OÙ l'investissement est à double tranchant	28
<b>Interlude</b>	<b>41</b>
<b>II De la fidélité dans les couples, ou comment aller voir ailleurs quand l'autre y va</b>	<b>43</b>
1 De la diversité et de la spécificité dans la nature	44
2 De la robustesse des couples sur l'île de la tentation	52
<b>Discussion</b>	<b>74</b>
<b>1. Supputations physiologiques</b>	<b>74</b>
1.1. Mécanisme du bénéfice . . . . .	74
1.2. Mécanisme du coût . . . . .	75
1.3. Conflit d'intérêts : qui contrôle la rétention ? . . . . .	76

<b>2. L'évolution des symbioses, entre coopération et conflits</b>	<b>79</b>
2.1. Le continuum mutualisme-parasitisme : au-delà du concept, une réalité. . . . .	79
2.1.1. Des variations plastiques de coûts et de bénéfices . . . . .	80
2.1.2. Des mécanismes moléculaires communs aux mutualistes et aux pathogènes	81
2.2. Des conflits d'intérêts à l'instabilité . . . . .	84
2.3. Et pourtant elles tournent... . . . . .	86
2.3.1. De l'alignement des intérêts... . . . . .	87
2.3.2. ...à la spécificité . . . . .	89
<b>3. Conséquences évolutives du compromis</b>	<b>91</b>
3.1. Forme de la courbe de compensation et nature de l'équilibre évolutif . . . . .	92
3.2. Diversité de stratégies chez les nématodes entomopathogènes . . . . .	93
3.2.1. Chasseurs itinérants et chasseurs à l'affût . . . . .	93
3.2.2. L'infectivité échelonnée, ou l'art de répartir le risque . . . . .	94
3.2.3. Niveau d'exploitation de l'hôte . . . . .	94
<b>Conclusion</b>	<b>95</b>
<b>Perspectives...</b>	<b>96</b>
...écologiques . . . . .	96
...expérimentales . . . . .	96
...théoriques . . . . .	97
<b>Bibliographie</b>	<b>99</b>

## Liste des figures

Figure 1. Cycle de vie des complexes <i>Steinernema-Xenorhabdus</i> .	8
Figure 2. Stades infestants de <i>Steinernema carpocapsae</i> associés à <i>Xenorhabdus nematophila</i> marquée à la GFP.	9
Figure 3. Cinétique bactérienne dans l'insecte <i>Spodoptera littoralis</i> après injection expérimentale de 800 bactéries de l'espèce <i>Xenorhabdus nematophila</i> .	12
Figure 4. Reproduction des nématodes <i>S. carpocapsae</i> et <i>S. scapterisci</i> associés ou non à leur symbiote.	14
Figure 5. Effet dose sur la réussite parasitaire et cinétique bactérienne dans l'insecte.	75
Figure 6. Un stade infestant de <i>Steinernema carpocapsae</i> portant des bactéries symbiotiques.	86

## Liste des tables

Table 1. Bilan des coûts et bénéfices de l'association symbiotique pour chaque partenaire selon la phase du cycle de vie.	15
---	----

## Liste des encadrés

Encadré 1. Lutte entre l'insecte et le couple némato-bactérien.	10-11
Encadré 2. Dans l'intimité de la symbiose : les gènes de reconnaissance.	78-79
Encadré 3. Les systèmes régulateurs à deux composantes.	83

# **Introduction**



## Contexte général

La compréhension des mutualismes est un champ de recherche très fertile en biologie évolutive. Les symbioses mutualistes<sup>1</sup> sont des interactions durables à bénéfices réciproques impliquant des organismes d'espèces différentes. Les interactions durables peuvent se répartir sur un continuum parasitisme–symbiose mutualiste en fonction du bilan global bénéfices–coûts de l'interaction pour chaque partenaire. Ce bilan est positif pour les deux partenaires du côté du mutualisme et négatif pour l'un des partenaires du côté du parasitisme. Un point important de la définition des mutualismes est qu'on considère un bilan *global*, et quelques études ont mis en évidence l'existence de coûts dans les interactions mutualistes. Par exemple, la jacinthe d'eau *Pontederia cordata* consacre 3% de son budget énergétique à la production de nectar consommé par ses pollinisateurs (Harder and Barrett 1992) ; *Citrus volkameriana*, lui, dépense 37% de son budget carbone pour entretenir ses champignons mycorhiziens (Peng et al. 1993). Malgré ces coûts, les mutualismes semblent très répandus dans la nature, au point que Janzen (1985) estime que tout organisme sur Terre est impliqué dans au moins une interaction mutualiste au cours de sa vie. Considérées dans un cadre strictement darwinien, les symbioses mutualistes posent donc problème : comment deux organismes d'espèces différentes peuvent-ils durablement entretenir des relations bénéfiques pour le partenaire mais coûteuses pour eux-mêmes ? Ceci est *a priori* en contradiction avec l'égoïsme darwinien selon lequel «Comme il naît beaucoup plus d'individus de chaque espèce qu'il n'en peut survivre, [...] il se produit souvent une lutte pour la vie» (Darwin 1859). Les symbioses mutualistes, loin d'être un chemin de roses, résultent en fait d'un équilibre (fragile ?) entre les coûts et les bénéfices pour chaque partenaire, chacun ayant intérêt à augmenter les seconds et à minimiser les premiers. Les conflits d'intérêts y sont la règle, à tel point que les symbioses mutualistes sont aussi définies comme des parasitismes réciproques régulés (d'après Combes 1995 ; 2001 ; HacsKaylo 1972). D'ailleurs, plusieurs exemples de passage d'une interaction parasitaire à une interaction mutualiste (et réciproquement) ont été démontrés. Illustrons le premier cas : une souche californienne de *Wolbachia* qui diminuait la fécondité de son hôte *Drosophila simulans* de 15-20% il y a vingt ans, l'augmente maintenant de 10% par rapport à celle des mouches non infectées (Weeks et al. 2007). Réciproquement, l'évolution de la mycohétérotrophie montre à quel point une association mutualiste, la mycorhize<sup>2</sup>, peut être détournée à leur profit par certaines plantes, qui deviennent des puits de carbone parasitant les plantes autotrophes alentour par champignon interposé (Leake 1994).

Les conflits d'intérêts entre partenaires sont déterminants pour l'évolution de la nature de l'interaction et peuvent même la déstabiliser à l'échelle évolutive. Se pose alors la question de la stabilité des mutualismes. En effet, malgré l'existence de ces conflits d'intérêts, certaines symbioses mutualistes sont supposées être très anciennes, ce qui suggère l'existence de forces stabilisatrices. La riposte en est un exemple : elle consiste à imposer un coût supplémentaire

---

<sup>1</sup>Nous précisons symbioses **mutualistes** afin d'éviter toute confusion avec le terme anglo-saxon «symbioses» qui, conformément au sens originel (de Bary, 1879) et étymologique (du grec σύν, avec et βίος, vie), désigne les interactions durables en général, sans préjuger de leur nature mutualiste ou parasitaire.

<sup>2</sup>Dans ces associations, le champignon apporte à la plante de l'eau et des sels minéraux en échange de matière organique.

aux individus qui exploitent le partenaire. Ces sanctions envers les tricheurs ont été notamment décrites sur les systèmes *Yuccas-Tegeticula* (Pellmyr and Huth 1994) et Fabacées-*Rhizobium* (Kiers et al. 2003). La description fine des coûts et bénéfices d'une interaction pour chaque partenaire est donc cruciale pour comprendre sa stabilité et son évolution.

La mise en évidence des conflits d'intérêts est difficile car le coût qui leur est associé est masqué par les bénéfices de l'association mutualiste. Pour cette raison, rares sont les études qui ont évalué, sur un même système biologique et dans une même expérience, les coûts et les bénéfices afin d'accéder à ce bilan global (voir par exemple Peng et al. (1993)). La première partie du présent travail apporte quelques éléments de réflexion à ce sujet : nous montrons que la symbiose étudiée ici est à la fois bénéfique et coûteuse pour un des partenaires et que le bilan de l'interaction, globalement positif, varie en fonction des conditions environnementales.

Dans ce qui précède, on a considéré des symbioses obligatoires pour les deux partenaires, «verrouillées», les velléités d'exploitation de l'un étant contrées par les sanctions de l'autre, sans échappatoire possible. Mais on peut aussi imaginer des interactions dans lesquelles les conflits d'intérêts amèneraient un partenaire à quitter l'autre, relâchant ainsi la spécificité. Ainsi, des pollinisateurs peuvent abandonner une plante hôte s'ils trouvent une source de nectar plus importante ailleurs (Bronstein 1995). Le même mécanisme pourrait agir dans les symbioses mutualistes : si l'hôte exploite son symbiote de manière excessive, cela peut inciter ce dernier à changer d'hôte. Réciproquement, un symbiote trop gourmand peut se voir sanctionné par l'hôte, éventuellement au profit d'une souche moins coûteuse : contre-sélectionner des partenaires peu efficaces ou trop coûteux est déjà un pas vers la spécificité. Comprendre la stabilité d'une interaction mutualiste nécessite donc non seulement de connaître les coûts et bénéfices pour les partenaires, mais aussi d'appréhender la spécificité de l'association. La spécificité en elle-même pose un problème d'un point de vue évolutif : pourquoi fermer la porte à des partenaires potentiels et se spécialiser sur un seul ? Cette question peut être ramenée au contexte plus général de la spécialisation écologique, pour laquelle, empiriquement, « il existe autant de facteurs affectant [son] évolution que de cas de spécialisation » (Ravigné 2003). Assez bien étudiée chez les insectes phytophages, la spécialisation semble notamment favorisée par les adaptations hôtes-spécifiques, l'existence de compensations sur l'adaptation aux habitats, la compétition intraspécifique pour l'accès à la nourriture ou l'abondance et la visibilité des plantes-hôtes (V. Ravigné citant Jaenike (1990)). Ces mêmes facteurs pourraient être invoqués pour expliquer, dans les interactions durables, l'évolution de la spécialisation sur un partenaire, appelée dans ce cas spécificité. En effet, la spécificité peut être favorisée si augmenter les performances avec un partenaire entraîne une diminution des performances avec un autre, si chacun reste coincé dans sa niche parce que toutes sont occupées ou si le partenaire actuel est le plus abondant. Toutefois, dans les symbioses mutualistes, la variabilité dans l'espace et le temps du bilan coûts-bénéfices pour chaque partenaire pourrait favoriser une spécificité modérée, qui autoriserait un changement de partenaire en cas de dégradation des relations. La deuxième partie de ce travail explorera la spécificité d'association d'un point de vue écologique (chapitre 1) et expérimental (chapitre 2). Je terminerai par des considérations générales visant à faire converger les deux

axes d'étude, investissement et spécificité, et proposerai quelques perspectives à ce travail.

## Modèle biologique

### Pourquoi les nématodes entomopathogènes ?

L'évaluation des coûts et bénéfices d'une association requiert la comparaison des performances de l'hôte avec et sans symbiote. L'approche expérimentale de la spécificité exige quant à elle de pouvoir réassocier un hôte avec différents symbiotes non natifs. Ceci amène naturellement à travailler sur une symbiose facultative pour au moins un partenaire, du point de vue duquel on se placera pour évaluer les coûts, les bénéfices et la spécificité de l'association. Les complexes némato-bactériens étudiés ici cumulent plusieurs avantages qui en font un modèle de choix pour aborder expérimentalement l'évolution des symbioses : partenaires cultivables séparément et à coût raisonnable, cycle de vie rapide, nombreux couples nématodes-bactéries au sein du genre considéré, facilité de conservation, faible encombrement... L'approche évolutive de ce modèle a été initiée par Mathieu Sicard (Sicard 2003), en thèse dans l'équipe Interactions de 2000 à 2003 et poursuivie par moi-même dans ce travail.

### Qui est qui ?

On connaît deux genres de nématodes entomopathogènes : *Steinernema* (du nom de son découvreur, Steiner 1923) et *Heterorhabditis* (Poinar 1976). Ces nématodes sont tous deux des Rhabditidae (de ῥάβδος, baguette), taxon paraphylétique<sup>3</sup> (Blaxter et al. 1998). Les genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* sont phylogénétiquement éloignés, les premiers étant branchés plus basalement que les seconds (Blaxter et al. 1998). Ils sont respectivement associés à des bactéries des genres *Xenorhabdus* (de ζένος, hôte) et *Photorhabdus* (de φωτός, lumière, de nombreuses *Photorhabdus* étant bioluminescentes), toutes deux des Entérobactéries<sup>4</sup>. *Photorhabdus*, qui était inclus dans le genre *Xenorhabdus* et n'a acquis son propre statut de genre que récemment (Boemare et al. 1993), et *Xenorhabdus* sont des genres frères au sein des Entérobactéries.

Ces nématodes sont ubiquistes : ils ont été trouvés sur tous les continents sauf en Antarctique (Griffin et al. 1990). Les nématodes du genre *Heterorhabditis* semblent préférer les sols sableux (Hominick 2002) ; les préférences écologiques des *Steinernema* varient entre espèces, des prairies aux forêts en passant par les champs cultivés. Ils sont traditionnellement qualifiés de parasites généralistes car capables d'infecter de très nombreux insectes en conditions de laboratoire (Laumond et al. 1979). Ce résultat doit être considéré avec précaution : les conditions d'infestation en laboratoire sont probablement plus favorables que dans la nature, ce qui pourrait élargir artificiellement le spectre d'hôtes.

Plusieurs équipes ont essayé de priver des nématodes *Heterorhabditis* de leur symbiote, par exemple afin d'utiliser les nématodes aposymbiotiques comme témoins négatifs pour comparer

---

<sup>3</sup>Il faudrait y inclure les Strongylidés, parasites de Vertébrés, et les Diplogastéridés, nématodes libres, pour que ce taxon devienne monophylétique.

<sup>4</sup>Cette famille de bactéries *Gram*<sup>-</sup> comprend notamment le colibacille, les salmonelles et l'agent de la peste.

les traits d'histoire de vie des nématodes associés *versus* non-associés. Ces tentatives se sont révélées peu fructueuses : les stades infestants obtenus sont incapables de tuer l'insecte et de s'y reproduire (Han and Ehlers 2000). La symbiose est donc obligatoire pour ce nématode. Chez certaines espèces du genre *Steinernema*, au contraire, des stades infestants dépourvus de bactéries sont cultivables sur l'hôte insecte *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae) ; c'est pourquoi mes expériences ont été conduites sur ce genre de nématodes.

## Qui fait quoi ?

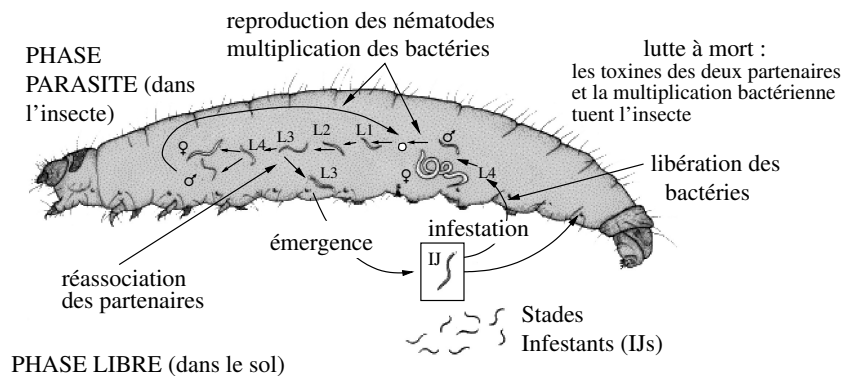


FIG. 1 – Cycle de vie des complexes *Steinernema - Xenorhabdus* (dessin N. Le Brun).

Le cycle de vie des complexes *Steinernema-Xenorhabdus* comporte deux phases (Figure 1) :

- **une phase libre, dans le sol**, où les stades infestants du nématode (troisièmes stades larvaires) portent leur symbiote bactérien dans leur tube digestif,
- **une phase parasite, dans l'insecte**, où les deux partenaires, nématodes et bactéries, se multiplient côte à côte.

**1. Phase libre.** Les nématodes trouvés à l'état libre dans les sols sont des troisièmes stades larvaires spécialisés en stades infestants (équivalents des *dauer larvae* chez *Caenorhabditis elegans*). Contrairement aux troisièmes stades larvaires qui restent dans l'insecte<sup>5</sup>, les stades infestants ont des organes sensoriels et une musculature plus développés, une double cuticule<sup>6</sup>, un tube digestif fermé aux deux extrémités et dont les tissus sont altérés et des canaux excréteurs moins nombreux (Poinar and Leutenegger 1968). Ces différences anatomiques sont à relier aux différences de mode de vie des stades infestants *versus* intra-insecte : vie libre sans prise alimentaire pour les premiers, confinée dans la ressource insecte pour les seconds. Les stades infestants portent les symbiotes bactériens (extracellulaires) dans un diverticule du tube digestif appelé vésicule de Bird et Akhurst. Cette vésicule est présente chez tous les *Steinernema* recensés à ce jour (mais pas chez les *Heterorhabditis*), et la présence de bactéries symbiotiques n'est pas nécessaire à son développement (Bird and Akhurst 1983). Cette singularité anatomique n'est donc

<sup>5</sup>Ceux-ci muent en quatrième stades larvaires, puis en adultes qui se reproduisent.

<sup>6</sup>La cuticule du deuxième stade larvaire (L2) n'est pas exuvée.

pas le résultat d'une réponse plastique à la présence des bactéries, mais bien le signe d'une co-évolution entre les deux partenaires. Les stades infestants (IJs<sup>7</sup>) peuvent survivre plusieurs mois dans le sol (Kung et al. 1990 ; Koppenhoefer and Fuzy 2003).

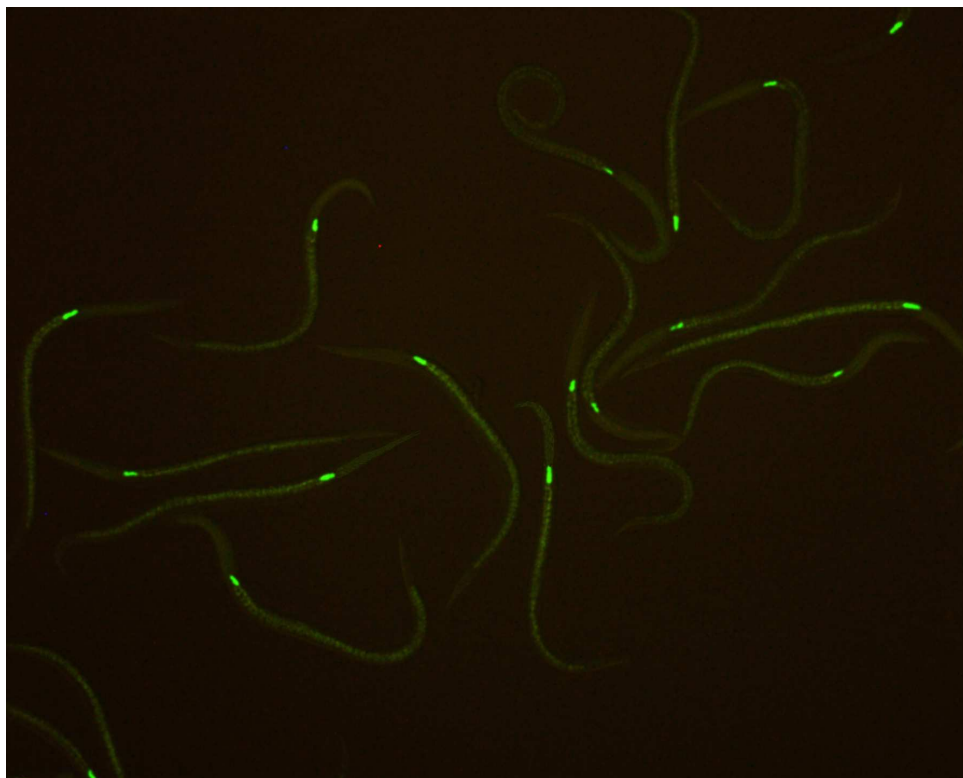


FIG. 2 – Stades infestants (IJs) de *Steinernema carpocapsae* associés à *Xenorhabdus nematophila*. Le symbiote bactérien a été transformé avec un plasmide codant la Green Fluorescent Protein ce qui permet de visualiser la vésicule des nématodes. La vésicule mesure environ 30  $\mu\text{m}$  de long par 7 de large (Flores-Lara et al. 2007). Longueur d'un stade infestant : environ 0,5 millimètre. Microscope à fluorescence Leica, gracieusement prêté par I. Hernandez et B. Romestand, Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, UMR 5119.

**2. Infestation.** Plusieurs signaux émanant des insectes<sup>8</sup> attirent les stades infestants de nématodes : dioxyde de carbone (O' Halloran 2003), composés cuticulaires volatils (Grewal et al. 1997), vibrations (Torr et al. 2004). Quand ils rencontrent un hôte insecte dans le sol, les nématodes l'infestent par les voies naturelles (bouche ou anus).

**3. Lutte à mort.** C'est vraisemblablement le contact avec le bol alimentaire de l'insecte qui induit la perte de la cuticule L2 des nématodes (Sicard et al. 2004a). Les bactéries présentes à la surface des stades infestants et dans l'espace séparant les cuticules L2 et L3 déclenchent la réponse immunitaire de l'hôte insecte : production de peptides antimicrobiens et activation de la cascade phénol-oxydase (Brehélin et al. 1989). Cette réponse immunitaire élimine les conta-

<sup>7</sup>Afin d'éviter l'ambiguïté de l'abréviation française **L3** (qui désigne simplement les troisièmes stades larvaires sans autre précision), nous préférons l'abréviation anglo-saxonne **IJs** (pour Infective Juveniles) pour désigner les stades infestants de nématode.

<sup>8</sup>Ou de leur environnement : une étude a montré qu'un sesquiterpène d'origine végétale, le (E)- $\beta$ -caryophyllène, produit lors d'une attaque des racines de maïs par l'insecte brouteur *Diabrotica virgifera*, attire le nématode entomopathogène *Heterorhabditis megidis*. La plante recrute ainsi les ennemis de ses ennemis sur les lieux de l'agression (Rasmann et al. 2005).

minants tégumentaires du nématode. Les nématodes percent la paroi intestinale de l'insecte et ingèrent de l'hémolymphe, ce qui déclenche la libération des symbiotes bactériens par défécation (Poinar 1966). Les deux partenaires, nématodes et bactéries, produisent alors diverses toxines qui immuno-dépriment l'insecte en s'attaquant à la fois à ses défenses cellulaires et humorales (voir Encadré 1 et Figure 3). Ils provoquent la mort de l'insecte en 48-72h (Akhurst 1980). Ceci les rapproche des parasitoïdes, qui tuent leur hôte plus rapidement que des parasites «classiques», ce qui réduit la durée de l'interaction à l'échelle des organismes.

## Encadré 1. Lutte entre l'insecte et le couple némato-bactérien.

### L'agressé : l'insecte.

Le système immunitaire des insectes présente deux types de défenses :

- des **défenses cellulaires**, dont les acteurs sont les différents types d'hémocytes (la nomenclature utilisée ici est celle de Ribeiro and Brehélin (2006) sur les Lépidoptères) :
  - les **granulocytes**, spécialisés dans la phagocytose, interviennent en cas d'infection par des microparasites. Ils participent également à l'initiation de l'encapsulation,
  - les **plasmatoctes**, acteurs de l'encapsulation, sont impliqués dans la défense contre les parasites de grande taille par rapport à la taille de l'insecte. Ils s'agglomèrent au contact du corps étranger en plusieurs couches de cellules, et la capsule ainsi formée isole l'intrus du reste de l'organisme,
  - les **oenocytoïdes** synthétisent la phénoloxydase, libérée dans l'hémolymphe par la lyse de ces cellules. Cette enzyme intervient dans la mélanisation après encapsulation : la capsule s'imprègne de mélanine, substance inerte qui parachève son isolement du milieu intérieur de l'insecte. La cascade de mélanisation, de plus, fait apparaître des produits cytotoxiques (quinones).

Ces cellules contiennent diverses enzymes (protéases, lysozyme) qui hydrolysent les peptidoglycannes de la paroi bactérienne.

- des **défenses humorales** :
  - **peptides anti-microbiens** cationiques, synthétisés par le corps gras (équivalent fonctionnel du foie) et induits lors de l'agression bactérienne (notamment au contact des lipopolysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne). Les plus connus sont les défensines et les cécropines, qui adhèrent à la membrane bactérienne (électronégative) par interaction électrostatique et y forment des pores,
  - diverses voies de signalisation dont la cascade pro-phénoloxydase, similaire au système du complément chez les Vertébrés. Cette voie active la sécrétion d'opsonines, molécules proches des lectines qui se lient aux motifs bactériens et facilitent la phagocytose et l'encapsulation (Lavine and Strand 2002),

- des Pattern Recognition Receptors (PRRs) qui reconnaissent des molécules microbiennes conservées. Leur expression est stimulée par l'infection bactérienne et conduit à l'activation des hémocytes et à la sécrétion d'antimicrobiens. Certains sont sécrétés, d'autres membranaires ou cytoplasmiques.

L'agresseur : le couple nématode-bactérie.

### La bactérie

L'agression du système immunitaire de l'insecte porte sur ses deux composantes, cellulaire et humorale :

- contre l'immunité cellulaire : induction de nécroses, d'apoptose des hémocytes (Vigneux et al. 2007), désorganisation du cytosquelette ; inhibition de la phagocytose par *Photorhabdus luminescens* grâce à un effecteur similaire à celui de l'agent de la peste (Brugirard-Ricaud et al. 2005), inhibition de l'encapsulation par inhibition d'une phospholipase inductrice d'une voie conduisant à l'agrégation des hémocytes (Kim et al. 2005),
- contre l'immunité humorale : inhibiteurs de l'expression des peptides anti-microbiens (Ji and Kim 2004 ; Park et al. 2007) et des voies de signalisation.

De plus, les bactéries *Photorhabdus* échappent à la réponse immunitaire précoce de l'insecte en produisant *AI2<sup>a</sup>*, une molécule signal nécessaire à la résistance aux espèces réactives de l'oxygène (Krin et al. 2006). Ces dérivés de l'oxygène sont cytotoxiques et produits par le système immunitaire de l'insecte, notamment lors de la mélanisation de la capsule.

### Le nématode

Un facteur immuno-dépresseur détruisant les protéines immunitaires de l'insecte a été identifié chez *S. carpocapsae* par Goetz et al. (1981). D'autre part, un peptide thermo-sensible de 70 kDa est présent chez cette même espèce et provoquerait, par injection, la mort de l'insecte (Simoes 1994). Chez *Steinernema glaseri*, une protéine du glycocalyx<sup>b</sup> du nématode inhibe chez l'insecte l'encapsulation et la phagocytose (Wang and Gaugler 1999). Plus récemment, Brivio et al. (2006) ont montré que les lipides cuticulaires de *Steinernema feltiae* inhibent l'action d'une protéine de l'hémolymphe qui induit l'expression des peptides antimicrobiens.

---

<sup>a</sup>AI pour Auto Inducer, cette molécule étant également un signal de *quorum-sensing* qui intervient dans la formation de biofilms (Krin et al. 2006).

<sup>b</sup>Manteau glycoprotéique et glycolipidique recouvrant, entre autres, l'hémimembrane externe de cellules animales, la paroi de certaines bactéries et la cuticule des nématodes (environ 5 nm d'épaisseur chez *C. elegans*). Particulièrement abondant au niveau des épithélia, il est impliqué dans l'adhésion et le pouvoir invasif de certains pathogènes.

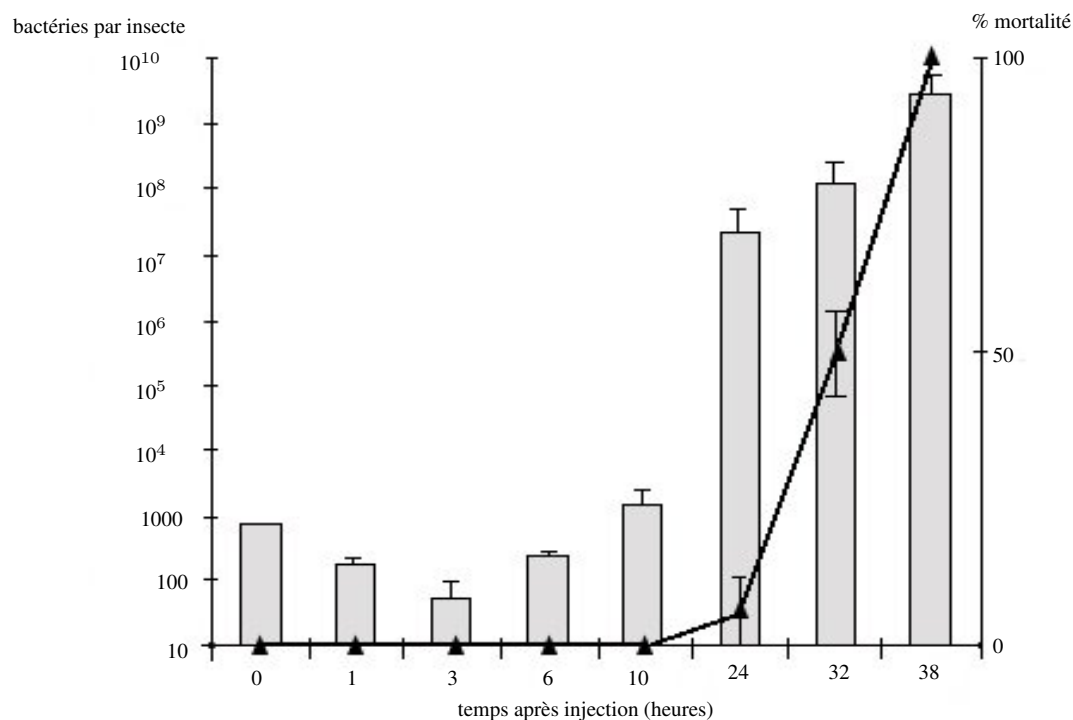


FIG. 3 – Cinétique bactérienne dans l'insecte après injection expérimentale de 800 cellules de *Xenorhabdus nematophila* dans une chenille de *Spodoptera littoralis* (Sicard et al. 2004a). La décroissance initiale de la population bactérienne correspond à la clairance<sup>10</sup> par le système immunitaire de l'insecte.

<sup>10</sup>Le mot *clairance* est la traduction du terme anglais *clearance*, qui désigne l'aptitude d'un organe ou d'un tissu à éliminer d'un fluide de l'organisme une substance déterminée. Nous l'utilisons ici au sens large pour désigner l'aptitude d'un système (le système immunitaire) à éliminer de l'hémolymphe des organismes (les bactéries pathogènes).



**4. Multiplication parallèle des deux partenaires.** Les nématodes muent en quatrièmes stades larvaires (L4), puis en adultes gonochoriques qui se reproduisent. Deux ou trois générations de reproduction sexuée ont lieu dans l'insecte, pendant lesquelles les nématodes se nourrissent des tissus de l'insecte métabolisés par leurs bactéries symbiotiques et des bactéries elles-mêmes (Poinar and Thomas 1966). Les bactéries continuent leur multiplication et envahissent complètement le cadavre de l'insecte. Les bactéries symbiotiques sécrètent des antibiotiques à spectre large (toxiques envers d'autres genres de bactéries, Paul et al. 1981 ; Akhurst 1982 ; Mc Inerney et al. 1991) et d'autres à spectre étroit : les xénorhabdicines, toxiques envers d'autres espèces de *Xenorhabdus* (Thaler et al. 1995), voire envers d'autres souches de la même espèce que la souche productrice (Tabart 2003). Elles sécrètent également des substances toxiques envers des nématodes (Samaliev et al. 2000 ; Webster et al. 1998 ; voir Hu et al. (1999) ; Han and Ehlers (1999) et Sicard et al. (2007) pour des études sur *Photorhabdus*), possibles manifestations d'une évolution en partie mue par la compétition entre couples.

**5. Recrutement du symbiote et sortie.** Les nouvelles L2 formées avalent quelques bactéries qui, cette fois, ne seront pas digérées : elles initieront la colonisation de la vésicule et seront à l'origine du chargement symbiotique transporté par les nématodes libres (Martens et al. 2003). Ces L2 deviennent des L3 qui, au lieu de muer en L4 puis en adultes, arrêtent leur développement et se transforment en stades infestants (cf ci-dessus). Le signal induisant l'arrêt de développement est inconnu mais deux mécanismes sont plausibles : déplétion des ressources dans le cadavre d'insecte et forte densité des nématodes (Popiel et al. 1989). Ces nouveaux stades infestants, qui portent les bactéries symbiotiques dans leur tube digestif, sortent du cadavre décomposé et regagnent le sol à la recherche de nouveaux hôtes. La bactérie qui ressort de l'insecte est la descendante de celle qui y est entrée<sup>11</sup>, c'est pourquoi la transmission est qualifiée de pseudo-verticale. *Pseudo* seulement car, les nématodes étant gonochoriques, au moins deux individus de sexes opposés doivent entrer dans le même individu insecte pour que l'infestation fonctionne. Si les deux nématodes sont de souches différentes, cela peut entraîner une compétition entre nématodes et entre bactéries dans l'insecte. La bactérie gagnante (un seul clone le plus souvent, Martens et al. (2003)) peut ainsi être transmise à d'autres nématodes que son partenaire natif. A une plus large échelle phylogénétique, ces transferts horizontaux se retrouvent dans la non-congruence des phylogénies des nématodes et des bactéries (Sicard 2003).

### Une symbiose mutualiste ?

Nous avons vu précédemment que les interactions durables s'échelonnent sur un continuum parasitisme-mutualisme en fonction du bilan coûts-bénéfices pour chaque partenaire. Les associations symbiotiques entre nématodes entomopathogènes et bactéries sont connues depuis 1980 (Akhurst 1980) mais 20 ans se sont écoulés sans que personne ne se penche sur la nature de l'interaction. Mathieu Sicard, en thèse dans l'équipe Interactions de 2000 à 2003, a expérimentalement privé certaines espèces de nématodes de leur symbiote bactérien afin de comparer

---

<sup>11</sup>Le temps de doublement de *X. nematophila* dans l'hémolymphe d'insecte est de 2h30 (Herbert and Goodrich-Blair 2007). Si on considère que la plupart des nématodes sortent du cadavre 14 jours après infestation, environ 140 générations séparent les bactéries entrantes des bactéries sortantes.

les traits d’histoire de vie des nématodes avec *versus* sans leur partenaire. Il a ainsi montré que l’association est bénéfique (voire obligatoire) pour le nématode (Sicard et al. 2003). En effet, le nématode se reproduit beaucoup mieux avec sa bactérie que sans chez *Steinernema carpocapsae* et *S. scapterisci* (Figure 4). Plus précisément, il réussit plus d’infestations<sup>12</sup> et produit plus de descendants en présence du symbiote. Une autre espèce de nématodes, *S. riobrave*, est incapable de se reproduire sans ses symbiotes, tout comme il avait été montré précédemment pour *S. glaseri* (Akhurst 1986) : la symbiose est obligatoire pour ces deux espèces de nématodes.

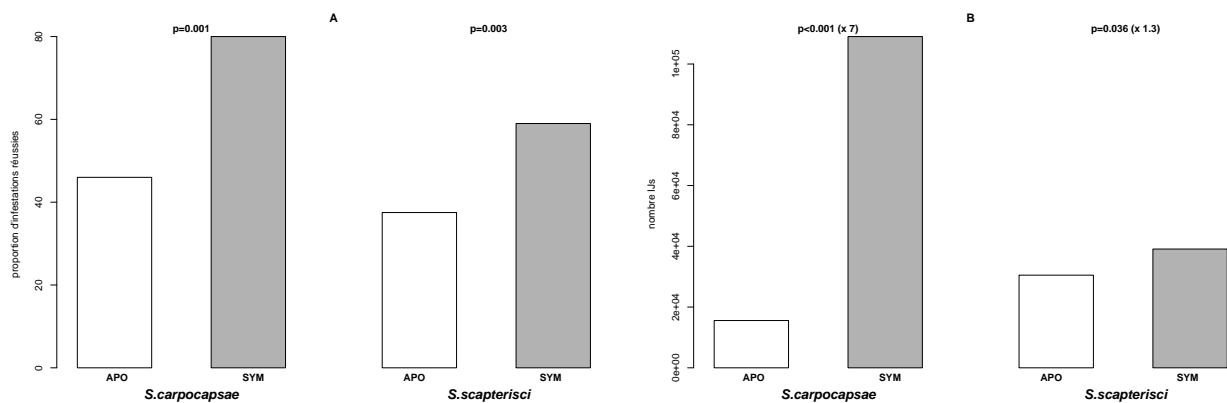


FIG. 4 – Reproduction de *Steinernema carpocapsae* et *S. scapterisci* associés (SYM) ou non (APO) à leur symbiote (*Xenorhabdus nematophila* et *X. innexi* respectivement). A. Réussite parasitaire : proportion d’infestations donnant des stades infestants viables. B. Succès reproductif médian : médiane du nombre de descendants par infestation réussie. Le chiffre entre parenthèses indique le rapport des succès reproductifs des nématodes sym- et aposymbiotiques. D’après Sicard et al. (2003).

Morgan et al. (1997) ont par ailleurs montré que la bactérie *X. nematophila* est incapable de survivre plus de quelques jours dans le sol, et qu’elle ne s’y multiplie pas. Elle serait protégée dans son vecteur nématode qui la transporte d’insecte en insecte, seuls milieux de culture naturels connus pour ces bactéries. La symbiose est de ce fait obligatoire pour la bactérie, qui semble incapable d’atteindre seule ses sites de multiplication.

L’association est donc à bénéfices réciproques : c’est un mutualisme. Toutefois, plusieurs indices suggèrent que les bactéries peuvent être coûteuses pour les nématodes.

Tout d’abord, Sicard et al. (2003) ont observé une très grande variabilité dans le nombre de symbiotes portés par nématode. Ils ont montré que *S. carpocapsae*, qui semble très dépendant de son symbiote pour la reproduction, porte beaucoup plus de bactéries que *S. scapterisci*, qui en est moins dépendant. Les auteurs suggèrent que les nématodes tendent à porter moins de bactéries lorsque l’interaction est facultative que lorsqu’elle est très bénéfique. Leur étude contient un contre-exemple : *S. riobrave*, qui porte en moyenne une bactérie par IJ et pour qui la symbiose est obligatoire dans les conditions expérimentales considérées. Toutefois, cette hypothèse d’une relation positive entre charge symbiotique et étroitesse de l’association pourrait suggérer que porter le symbiote est coûteux pour le nématode.

Deuxièmement, les mêmes auteurs ont observé que des bactéries du genre *Xenorhabdus*, mutualistes envers leur nématode natif, peuvent inhiber la reproduction d’une autre espèce de

<sup>12</sup>Une infestation est réussie lorsque le cadavre d’insecte émet des stades infestants vivants.

*Steinernema* (Sicard et al. 2004b). Ainsi, ces bactéries sont bénéfiques pour certains nématodes et pathogènes pour d'autres au sein même du genre *Steinernema*.

Enfin, l'argument le plus décisif provient d'une mesure directe du coût chez *Steinernema carpocapsae* (Mitani et al. 2004). Elle montre (i) que la survie des nématodes porteurs de bactéries est inférieure à celle des nématodes privés de leurs bactéries et (ii) que ce coût en survie dépend de la température à laquelle sont soumis les stades infestants du nématode : il est détecté au dessus de 25°C mais pas en dessous de 15°C.

Le tableau ci-dessous résume cette section.

	<b>bénéfices</b>		<b>coûts</b>	
	<b>pour le nématode</b>	<b>pour la bactérie</b>	<b>pour le nématode</b>	<b>pour la bactérie</b>
<b>Phase parasite</b>	reproduction	?	?	surinvestissement dans les toxines ?
<b>Phase libre</b>	?	protection et transport	mortalité	?

TAB. 1 – Bilan des coûts et bénéfices de l'association symbiotique pour chaque partenaire selon la phase du cycle de vie. Le tableau est symétrique : le nématode retire des bénéfices de l'association en phase parasite et rencontre des coûts en phase libre, et c'est l'inverse pour la bactérie. Les points d'interrogation indiquent que coûts et bénéfices pourraient co-exister pour un même partenaire dans une même phase du cycle, mais qu'ils sont difficiles à détecter et inconnus pour le moment.

### Une symbiose spécifique ?

Les symbioses nématobactériennes sont traditionnellement qualifiées de spécifiques car, partout dans le monde, chaque espèce de nématode est trouvée associée à la même espèce de bactéries (Boemare et al. 1997). Trois observations nuancent cette vision sans doute trop simplificatrice. Premièrement, chaque espèce de nématodes n'est certes associée qu'à une espèce de bactéries, mais la réciproque est fautive : *Xenorhabdus bovienii*, par exemple, est associée à plusieurs espèces de nématodes dont *Steinernema feltiae*, *S. kraussei*, *S. affine* et *S. sichuanense* (Akhurst and Boemare 1988 ; Boemare 2002 ; Mráček et al. 2006). Deuxièmement, de façon plus générale, les phylogénies des nématodes et de leurs bactéries symbiotiques ne sont pas exactement congruentes, ce qui prouve l'existence de transferts horizontaux, donc de changements de partenaires (Sicard 2003). Par exemple, *S. carpocapsae*, branché basalement dans la phylogénie des *Steinernema*, est associé à *X. nematophila*, branchée basalement dans la phylogénie des *Xenorhabdus*, alors que son espèce soeur, *S. scapterisci* est associée à un *Xenorhabdus* branché moins profondément que *X. nematophila* dans la phylogénie des *Xenorhabdus*. M. Sicard suspecte une acquisition secondaire du symbiote de *S. scapterisci* par transfert après perte du symbiote originel (Sicard 2003 p. 78). Troisièmement, des expériences de réassociations artificielles entre nématodes et bactéries montrent que seules les bactéries de la même

espèce que le symbiote natif sont retenues par les stades infestants de *Steinernema carpocapsae* et *S. scapterisci* (Sicard et al. 2004b ; 2005). En revanche, ces mêmes études montrent aussi que d'autres espèces de bactéries que le symbiote natif améliorent la reproduction des nématodes, par rapport à la reproduction des individus aposymbiotiques. Ces études font apparaître deux niveaux de spécificité dans les symbioses nématobactériennes :

- une spécificité de rétention, qui indique quelles bactéries sont retenues dans la vésicule du nématode et transmises à la descendance (via le compartiment insecte) lors de l'infestation suivante,
- une spécificité de reproduction, qui indique quelles bactéries augmentent la proportion d'infestations réussies par les nématodes et leur nombre de descendants en comparaison avec les nématodes dépourvus de bactéries.

Les trois points précédents montrent que la spécificité de rétention est grande. Le dernier montre que la spécificité de bénéfices l'est moins : d'autres bactéries que le symbiote natif peuvent améliorer la reproduction du nématode.

## Objectifs de la thèse

Grâce aux travaux de mes prédécesseurs, les bénéfices à l'association sont plutôt bien connus chez ces couples nématobactériens. Reste à explorer le côté obscur de la symbiose : ses coûts, ses compromis<sup>13</sup>, forces potentiellement déstabilisantes et importantes évolutivement. Ce sera là mon objectif premier, qui fera l'objet de la première partie de cette thèse. Plus précisément, nous nous efforcerons de répondre aux questions suivantes :

**Le coût de l'association pour le nématode est-il plus fort pour les espèces qui portent plus de symbiotes ?**

↪ première partie, chapitre 1.

Ce travail préliminaire permettra de valider, à l'échelle inter-spécifique, l'hypothèse d'un coût augmentant avec la charge symbiotique.

**Au sein d'une espèce, le coût en terme de survie du nématode est-il plus fort pour les individus qui portent plus de symbiotes ? De même, le bénéfice en terme de reproduction est-il plus fort pour les individus qui portent plus de symbiotes ? Si oui, la corrélation négative entre survie et reproduction qui résulte des précédentes est-elle retrouvée chez les nématodes privés de bactéries ?**

↪ première partie, chapitre 2.

---

<sup>13</sup>Le terme *compromis* est pris comme traduction du terme anglo-saxon *trade-off*, et désigne l'ensemble des contraintes physiologiques reliant deux traits de vie, ou encore la courbe de compensation qui délimite l'espace des phénotypes possibles.

Dans cette expérience, nous examinerons les variations de coûts, bénéfices et charge symbiotique à très petite échelle, entre individus au sein d'une même souche, afin d'entrer dans les rouages fins de la symbiose et de s'affranchir des difficultés des études comparatives.

Le deuxième objectif de la thèse est d'explorer la diversité et la spécificité de ces symbioses d'un point de vue écologique et expérimental. Plus précisément, nous nous pencherons sur les questions suivantes :

Quelles espèces de nématodes entomopathogènes se rencontrent localement autour de Montpellier ? A quelles souches de bactéries sont-elles associées ? Peut-il y avoir co-occurrence entre plusieurs espèces de nématodes, donc possibilité de compétitions ?

↔ deuxième partie, chapitre 1.

Cet échantillonnage de terrain dans l'Hérault et le Gard permettra d'identifier différents milieux occupés par les nématodes et d'évaluer la spécificité naturelle des associations.

La spécificité de rétention est-elle une règle générale chez les nématodes entomopathogènes ? La spécificité de reproduction démontrée à l'échelle inter-spécifique se retrouve-t-elle à l'échelle intra-spécifique ?

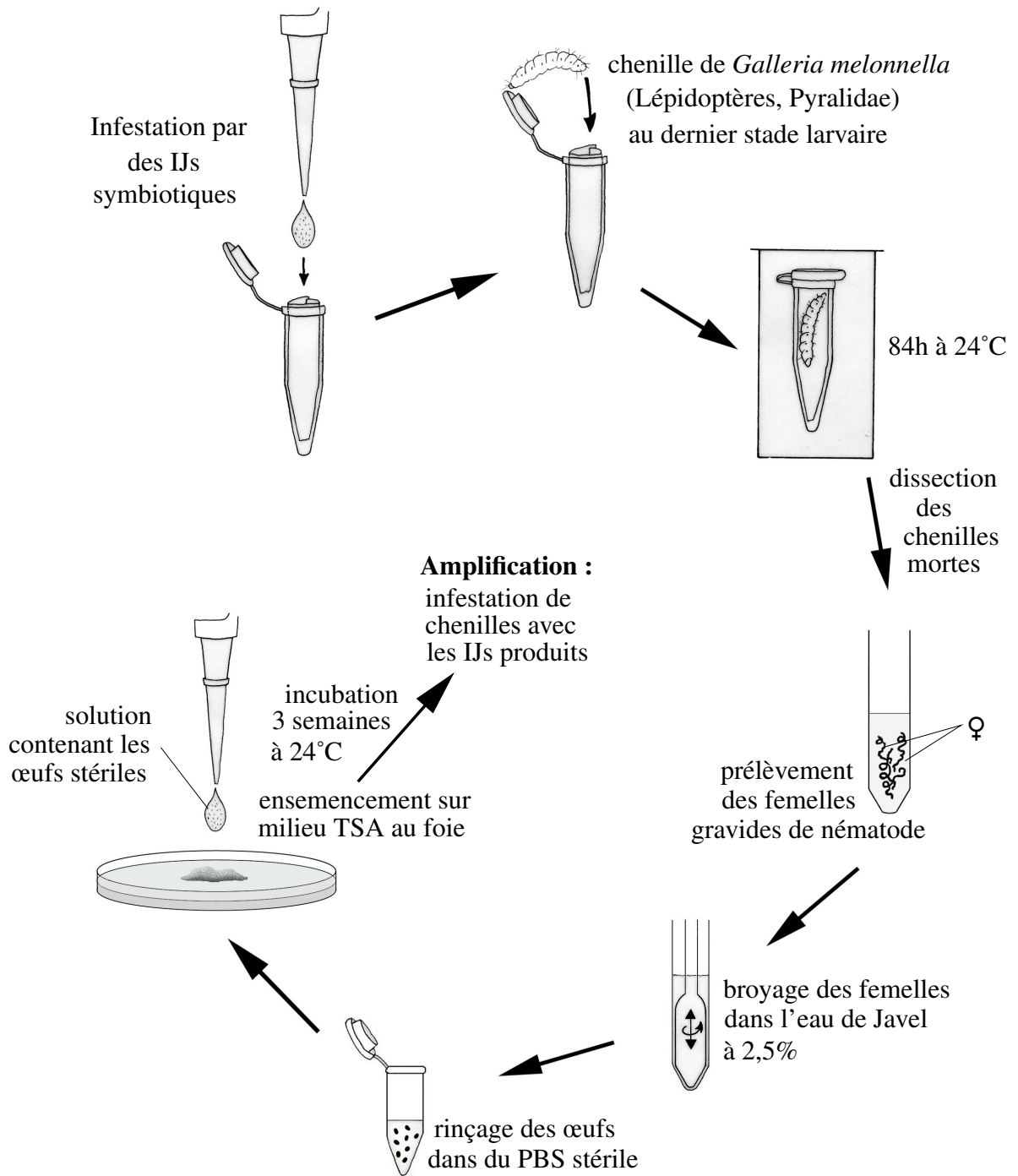
↔ deuxième partie, chapitre 2.

Les variations de bénéfices, coûts et charge symbiotique seront cette fois examinées à plus large échelle phylogénétique. Deux espèces de nématodes, *Steinernema carpocapsae* et *S. feltiae* seront réassociées avec diverses bactéries appartenant ou non à la même espèce que le symbiote naturel. Nous accèderons ainsi aux spécificités de rétention, de bénéfices et de coûts aux échelles inter-spécifique et intra-spécifique, inter-souche.

Pour atteindre ces objectifs, il nous faudra (i) infester expérimentalement des insectes avec des nématodes, en les réassociant à des bactéries natives et non natives et (ii) mesurer les traits d'histoire de vie (reproduction, survie, nombre de symbiotes par nématode) des couples ainsi formés. Les protocoles de ces expériences sont donnés ci-après (dessinatrice : N. Le Brun).

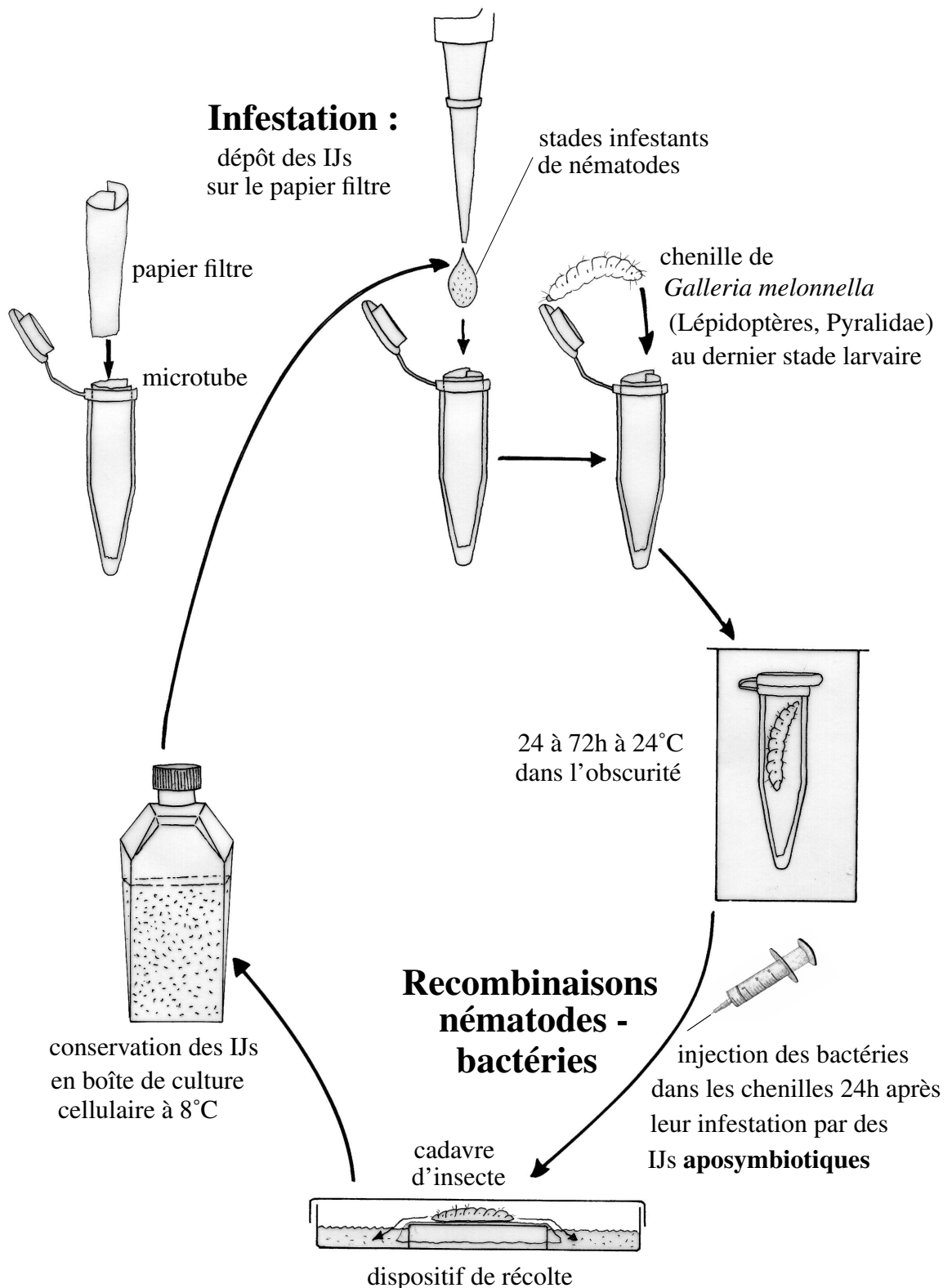
# **Méthodes expérimentales**

# Obtention de nématodes aposymbiotiques



Pour priver des nématodes de leur bactéries, on infeste des chenilles avec des nématodes symbiotiques. Après incubation, les chenilles sont disséquées dans du Ringer et les femelles de nématodes, gravidas, sont prélevées. Ces femelles sont reconnaissables par leur grande taille (environ 2 cm de long) et par la présence d'œufs. Après un broyage délicat qui libère les oeufs et deux rinçages dans du Ringer stérile, les oeufs en solution stérile sont déposés sur un milieu TSA au foie. Les boîtes sont observées régulièrement pour détecter, suite à l'éclosion des oeufs, l'apparition de troisièmes stades larvaires, qui seront utilisés pour infester des chenilles (amplification de la souche aposymbiotique).

# Cycle expérimental : infestations-recombinaisons



Les stades infestants de nématodes sont mis en contact avec une chenille de *G. mellonella*. Pour réassocier un nématode avec une bactérie, on infeste les insectes avec des nématodes **aposymbiotiques** et on injecte la suspension bactérienne dans les chenilles 24h après l'infestation par les nématodes. Le dispositif de récolte, constitué d'une «île» recouverte d'un tissu, permet aux nématodes émergent du cadavre de se déplacer dans le tissu mouillé puis dans l'eau entourant l'île, où ils sont faciles à récolter.



## Mesure de la reproduction

Les deux composantes de la reproduction sont la réussite parasitaire et le succès reproductif. La **réussite parasitaire** à une date  $t$  est la proportion d'infestations qui ont émis des nématodes vivants à cette date. Elle peut être conçue comme une probabilité de se reproduire. Elle est mesurée en observant, à la date voulue, les dispositifs de récolte pour détecter la présence de stades infestants.

Le **succès reproductif** est le nombre de stades infestants émis par infestation réussie. Il est mesuré deux mois après infestation en diluant un petit volume de la récolte (boîte de culture cellulaire) dans une boîte de Petri quadrillée et en le comptant, sous loupe binoculaire, avec un compteur manuel. Le compte de la boîte de Petri est ramené au volume total de la récolte afin d'obtenir le nombre total de nématodes produits par le cadavre d'insecte.

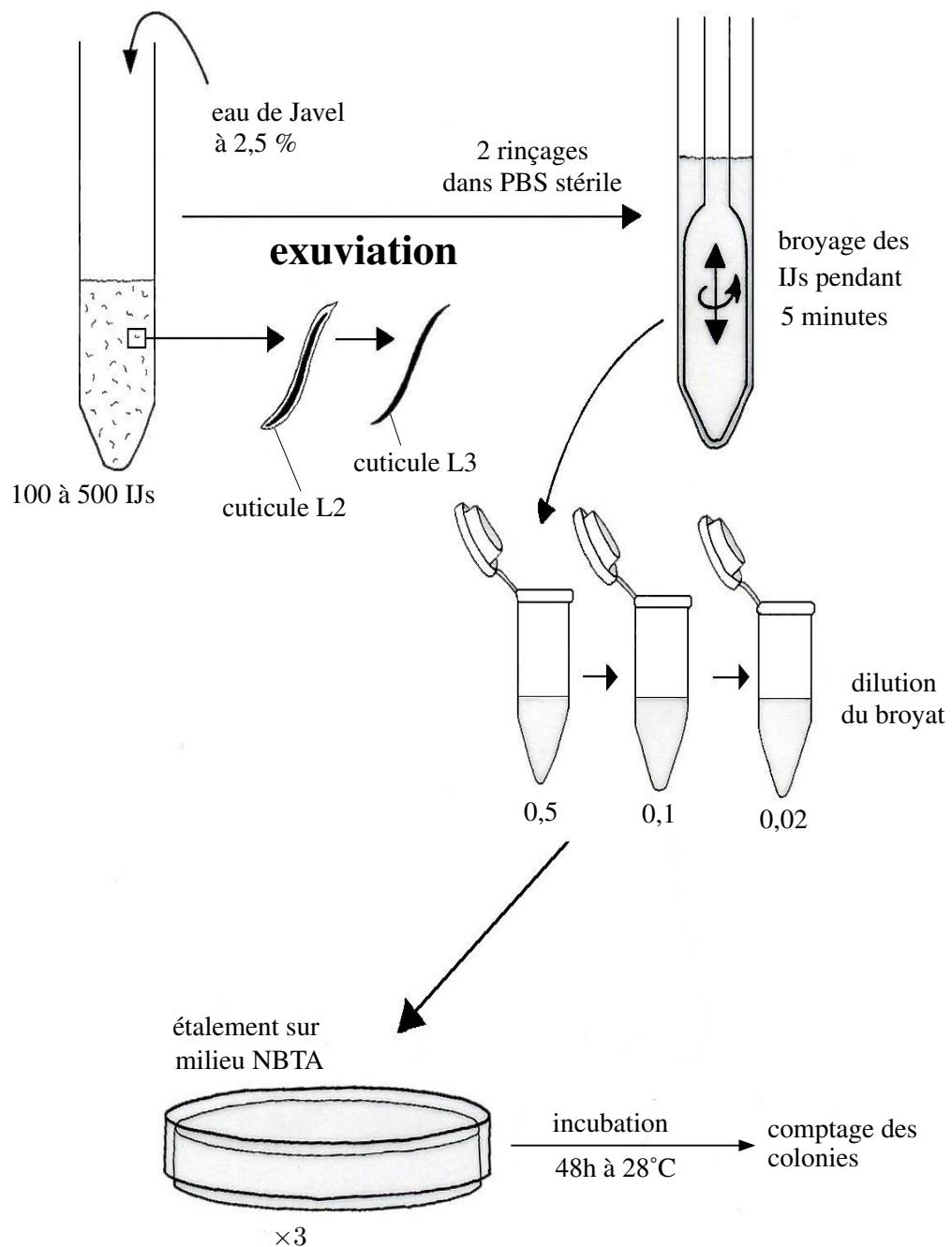
## Mesure de la survie



Stades infestants (IJs) de *Steinernema carpocapsae* associés à *Xenorhabdus nematophila*. Chez cette espèce, un stade infestant fait environ  $550 \mu m$  de long (Hominick et al. 1997). Le nématode du haut a une morphologie typique de mort : raide, épais et granuleux. Le nématode du bas est vivant.

Pour chaque estimation de survie, 1000 à 1200 IJs sont mis dans des petites boîtes de Petri quadrillées à  $24^{\circ}C$ , et le nombre de nématodes morts et vivants est compté après différentes durées (deux semaines à quatre mois selon l'espèce de nématodes).

## Mesure de la rétention : nombre de bactéries portées par nématode



Un lot de 100 à 500 stades infestants de nématodes est désinfecté dans de l'eau de Javel, ce qui permet d'éliminer la cuticule L2 non exuviée et de désinfecter superficiellement la cuticule L3. Après deux rinçages dans du Ringer stérile, les nématodes sont resuspendus dans du Phosphate Buffer Saline et broyés dans un Potter pendant cinq minutes. Le broyat est ensuite dilué et les dilutions sont étalées sur milieu NBTA qui permet de distinguer les colonies de *Xenorhabdus* (bleues) de celles des autres bactéries (rouges). Après incubation, les colonies bactériennes sont comptées, les comptes des différentes boîtes moyennés et le tout est ramené à la quantité de bactéries portée par **un** stade infestant.

## **Première partie**

**De l'investissement dans le couple, ou  
comment travailler plus sans gagner plus**

# Chapitre 1

## Où le symbiote peut s'avérer coûteux

Nous avons vu en introduction que plusieurs indices suggèrent, chez les nématodes, un coût à porter les bactéries : charge symbiotique variable entre espèces de nématodes, toxicité bactérienne envers des nématodes non-partenaires... Dans les mutualismes, les coûts à l'association sont très difficiles à détecter car ils sont le plus souvent masqués par les bénéfices. Les nématodes entomopathogènes ont un cycle de vie en deux phases : une phase parasite, où les bénéfices sont clairs pour le nématode (meilleure reproduction, voir Sicard et al. 2003) et une phase libre, où ils le sont moins. Nous allons donc plutôt chercher les coûts à l'association dans cette dernière phase, car alors ils risquent moins d'être masqués par des bénéfices. C'est ce qu'a fait précédemment Mitani et al. (2004) sur *Steinernema carpocapsae*. Le trait caractéristique des nématodes en phase libre est leur survie ; les auteurs ont donc comparé la survie de nématodes porteurs de bactéries (symbiotiques) avec celle de nématodes privés de leur symbiotes (aposymbiotiques), et ce à différentes températures. Ils ont détecté une sur-mortalité des nématodes symbiotiques à 25°C et 30°C, mais pas de sur-mortalité à 5°C ni à 15°C. Ceci conforte l'hypothèse d'un coût à porter les bactéries pour le nématode. L'absence d'effet à température modérée indique toutefois que ce coût est probablement faible en conditions naturelles.

Notre objectif, dans la continuité des travaux de Mathieu Sicard sur la comparaison des bénéfices entre espèces de nématodes (Sicard et al. 2003), est de comparer les coûts entre ces mêmes espèces. Pour cela, nous avons obtenu des nématodes de deux espèces : *Steinernema carpocapsae*, qui porte en moyenne 50 bactéries par nématode et *Steinernema scapterisci*, qui porte en moyenne moins d'une bactérie par nématode. Pour chaque espèce, nous avons comparé la survie à 24°C de nématodes symbiotiques et aposymbiotiques. Nos résultats montrent que *S. carpocapsae* survit moins bien avec sa bactérie que sans, donc qu'il subit un coût à porter des bactéries. Ce coût est indétectable chez *S. scapterisci*, ce qui suggérerait -avec toutes les précautions que la comparaison inter-spécifique et le faible nombre d'espèces étudiées imposent- que le coût est lié au nombre de bactéries portées.

## Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species

Vanya Emelianoff · Mathieu Sicard · Nathalie Le Brun · Catherine Moulia · Jean-Baptiste Ferdy

Received: 5 July 2006 / Accepted: 7 July 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** *Steinernema* species are entomopathogenic nematodes associated with *Xenorhabdus* bacteria. The life cycle of these associations is composed of two stages: (1) a free stage in the soil, where infective juveniles (IJs), which carry bacteria in their guts, search for new insect hosts; and (2) a parasitic stage, where the IJs infect insects, release their *Xenorhabdus* symbionts and reproduce in order to produce new IJs. Previous studies clearly showed benefits to the association for several *Steinernema* species during the parasitic stage. Nevertheless, no study has so far explored, during the free stage, the existence of costs or benefits to the association for different *Steinernema*. Here, we compared the survival of both symbiotic and aposymbiotic IJs in two nematode species: (1) *Steinernema carpocapsae*-exhibiting IJs that carry a high number of *Xenorhabdus* cells in their guts; and (2) its closely relative species, *S. scapterisci*-exhibiting IJs, that carry very few *Xenorhabdus* cells in their guts. We showed that the bacterial symbionts were costly for *S. carpocapsae* by increasing IJs' mortality but not for *S. scapterisci*. This difference in cost induced by bacteria to IJs during the free stage could be correlated with the difference in the numbers of bacteria carried by IJs of each nematode species.

### Introduction

*Steinernema* nematodes are symbiotically associated with Enterobacteriaceae of the genus *Xenorhabdus*. The lifecycle of these associations is composed of two stages: (1) the free stage, where infective juveniles (IJs), which carry bacteria in an intestinal vesicle, search for insect hosts in the soil; and (2) the parasitic stage, where IJs infect the insect, release their *Xenorhabdus* symbionts, develop into adults and reproduce in order to produce new IJs. All the tested *Steinernema* species demonstrated increased fitness during the parasitic stage when associated with their specific *Xenorhabdus* symbiont (Sicard et al. 2003). Nevertheless, some appeared less dependent on their native symbiont to reach an optimal fitness than others. For example, *Steinernema scapterisci* reproduced 1.3 more with its bacterial symbiont than without, whereas *S. carpocapsae* reproduced sevenfold more with its bacterial symbiont than without. Moreover, *S. scapterisci*, which was less dependent on its native symbiont to reproduce optimally within the insect hosts than *S. carpocapsae*, also transported a smaller amount of native symbionts within its intestinal vesicle: *S. scapterisci* harbours around 0.07 bacteria per IJ, whereas *S. carpocapsae* harbours around 50 bacteria per IJ (Sicard et al. 2003). On the other hand, a previous study mentioned the existence of possible extra mortality for symbiotic IJs compared to aposymbiotic IJs of *S. carpocapsae* after long-term storage at 25°C (Mitani et al. 2004). This suggests that while bacteria are always beneficial to the nematodes during parasitic stage, they could represent a cost during free stage. In this paper, we measured this potential cost in the two previously mentioned species of nematodes. For that purpose, we compared mortality of symbiotic IJs to that of aposymbiotic ones. From this, we can draw a more complete picture of the relationship of

V. Emelianoff · M. Sicard (✉) · N. Le Brun · C. Moulia · J.-B. Ferdy  
Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Adaptation,  
c.c. 63 CNRS-UM2-IFREMER UMR 5171,  
Université de Montpellier 2,  
Place Eugène Bataillon,  
34095 Cedex 05 Montpellier, France  
e-mail: sicard@univ-montp2.fr

these two nematodes species with their respective bacterial symbionts.

## Materials and methods

Aposymbiotic IJs of *S. carpocapsae* (strain SK27) and *S. scapterisci* (strain SE61) were obtained as previously described by Sicard et al. (2003). Aposymbiotic, as well as symbiotic nematode, strains are maintained in the laboratory by successive experimental infections of last instars of *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae). In order to obtain new emergences of aposymbiotic and symbiotic IJs of both nematode species, sets of 20 to 25 *G. mellonella* were infected as previously described by Sicard et al. (2003). After 3 days at 24°C, all insects were dead. Cadavers were then placed into ‘White traps’ at 24°C in order to collect offspring (i.e. IJs) emerging from each infestation (White 1927). After 2 months, for each nematode species, aposymbiotic and symbiotic IJs were separately pooled and placed into culture flasks in order to adjust nematode density to ~6,000 IJs/ml. At this time and for each of the four groups (aposymbiotic and symbiotic *S. carpocapsae* and aposymbiotic and symbiotic *S. scapterisci*), the percentages of dead IJs were assessed independently in five samples of 100 µl. Dead IJs were easy to distinguish from alive larvae because they exhibited typical curved and granular appearance and did not response to a tactile stimulus with a fine needle. Data were analysed using the general linear models routine in R software (Team 2005), assuming binomial distribution for residuals.

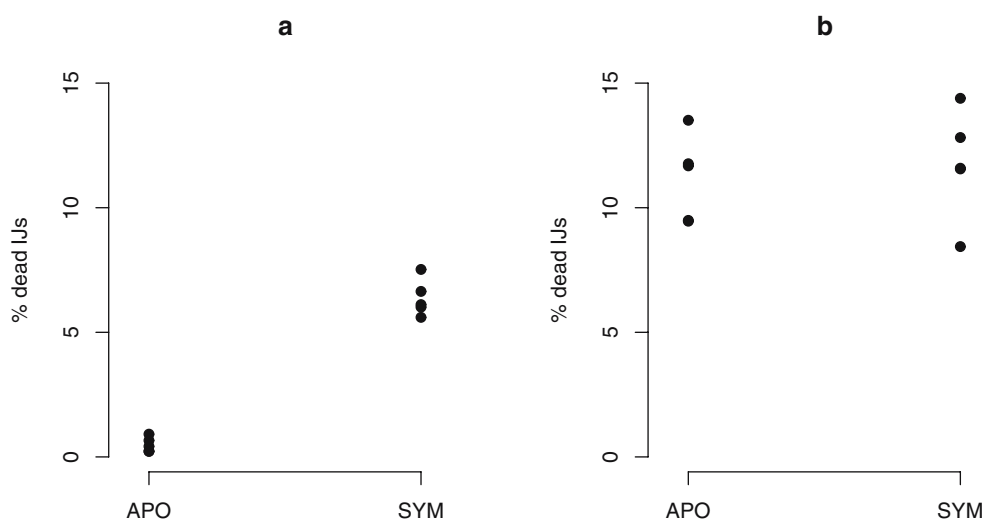
## Results

The mortality of *S. carpocapsae* IJs was significantly higher for symbiotic nematodes (median = 6.1%) than for aposymbiotic ones (median = 0.23%;  $F=147.31$ ,  $p<0.0001$ ). For *S. scapterisci*, the mortality of IJs did not significantly differ between symbiotic (median = 11.58%) and aposymbiotic (median = 11.68%;  $F=0.4696$ ,  $p=0.49$ ; see Fig. 1).

## Discussion

Sicard et al. (2003) showed that *S. carpocapsae* and *S. scapterisci* do not carry the same number of bacteria per IJ, and that the benefit they get from their bacterial symbionts is different. The comparison of mortalities between aposymbiotic and symbiotic IJs of *S. carpocapsae* and *S. scapterisci* revealed yet another difference between this two model systems: *Xenorhabdus* cells seemed to induce a cost for *S. carpocapsae* by increasing mortality of IJs, whereas such a cost was not detected for *S. scapterisci*. It has been previously shown that *Xenorhabdus* cells slowly multiply into IJ vesicle (Martens et al. 2003; Sicard et al. 2003). Such a multiplication certainly demands nutrients. The nutrients for bacteria can only come from nematodes as they are locked up in the worms without contact with the exterior. As IJs do not feed, their resources are limited. We can thus suspect that IJs that carry more *Xenorhabdus* cells lose more resources to maintain their symbionts than IJs that carry less *Xenorhabdus* cells. As *S. carpocapsae* IJs harbour 700-fold more bacteria per IJ than *S. scapterisci*, the cost of bacterial symbionts is certainly higher for *S. carpocapsae* than for *S. scapterisci*. This could explain the significantly higher mortality observed in symbiotic *S. carpocapsae* IJs compared to aposymbiotic IJs of the same

**Fig. 1** Mortality of aposymbiotic (APO) and symbiotic (SYM) IJs for two *Steinernema* species. **a** *S. carpocapsae* strain SK27, **b** *S. scapterisci* strain SE61



species and the insignificance of the same comparison for *S. scapterisci*. The existence of both costs and benefits of symbiosis is crucial in an evolutionary context because it could lead to trade-offs between different life history traits of the nematode. A high amount of bacterial cells in the IJs could, indeed, be at the same time costly in free stage but beneficial in parasitic stage. Such a trade-off could, in turn, explain why the amount of *Xenorhabdus* cells harboured in IJs is so variable among *Steinernema* species.

**Aknowledgements** We are grateful to Bernard Godelle and Noël Boemare for helpful comments on this work.

This work was supported by a PhD scholarship from the French Ministry for Education and Research (grant 17540-2005).

## References

- Martens EC, Heungens K, Goodrich-Blair H (2003) Early colonisation events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *J Bacteriol* 185:3147–3154
- Mitani DK, Kaya HK, Goodrich-Blair H (2004) Comparative study of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, reared on mutant and wild-type *Xenorhabdus nematophila*. *Biol Control* 29:382–391
- Sicard M, Le Brun N, Pagès S, Godelle B, Boemare N, Moulia C (2003) Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitol Res* 91:520–524
- White GF (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science* 66:302–303

## Chapitre 2

### Où l'investissement est à double tranchant

Les bénéfices à l'association pour le nématode (reproduction) sont plus importants pour *Steinernema carpocapsae*, qui porte en moyenne 50 bactéries par nématode, que pour *S. scapterisci*, qui porte en moyenne moins d'une bactérie par nématode (Sicard et al. 2003). Le coût à l'association (mortalité) est également plus fort chez *Steinernema carpocapsae* que chez *S. scapterisci* (chapitre 1). Les comparaisons inter-spécifiques nécessitent de contrôler les effets de la phylogénie afin de séparer la part de variation due à l'environnement de celle due à l'histoire des espèces, c'est pourquoi on ne peut tirer de conclusion hâtive de ces deux études, qui ne portent que sur trois et deux espèces respectivement. Toutefois, ces données suggèrent une relation entre reproduction, survie et charge symbiotique chez le nématode. Afin de la tester proprement, nous nous sommes placés à l'échelle intra-spécifique ce qui nous affranchit de la contrainte phylogénétique. Nous avons choisi *Steinernema carpocapsae* comme modèle d'étude car (i) c'est chez cette espèce que les coûts et bénéfices sont les plus clairs (Sicard et al. 2003) et (ii) le nombre de bactéries portées est variable entre individus et dans le temps chez cette espèce (Flores-Lara et al. 2007). Nous avons testé la corrélation entre bénéfices (reproduction) et rétention d'une part, entre coûts (mortalité) et rétention de l'autre chez les nématodes symbiotiques. Nos résultats montrent, aux effets parentaux et environnementaux près, que ces deux corrélations sont positives : plus les nématodes portent de bactéries, mieux ils se reproduisent et plus ils meurent vite. Nous avons également testé, chez les nématodes symbiotiques et aposymbiotiques, la corrélation résultante, i.e. celle qui lie mortalité et reproduction. Positive chez les nématodes symbiotiques, elle est indétectable chez les nématodes aposymbiotiques. Ainsi, les symbiotes induisent chez les nématodes qui les portent un compromis survie-reproduction absent chez les nématodes non associés : l'investissement du nématode dans le transport des bactéries est à la fois bénéfique (en phase parasitaire) et coûteux (en phase libre). Tous ces effets sont d'autant plus forts que les conditions environnementales sont défavorables et que le succès reproductif des parents est faible.



# A SURVIVAL-REPRODUCTION TRADE-OFF IN ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES MEDIATED BY THEIR BACTERIAL SYMBIONTS

Vanya Emelianoff,<sup>1,2</sup> Elodie Chapuis,<sup>1</sup> Nathalie Le Brun,<sup>1</sup> Magali Chiral,<sup>1</sup> Catherine Moulia,<sup>1</sup> and Jean-Baptiste Ferdy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, c.c. 63 CNRS-UM2 UMR 5554, Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Cedex 05 Montpellier, France

<sup>2</sup>E-mail: vanya.emelianoff@univ-montp2.fr

Received September 24, 2007

Accepted December 8, 2007

In this work, we investigate the investment of entomopathogenic *Steinernema* nematodes (Rhabditidae) in their symbiotic association with *Xenorhabdus* bacteria (Enterobacteriaceae). Their life cycle comprises two phases: (1) a free stage in the soil, where infective juveniles (IJs) of the nematode carry bacteria in a digestive vesicle and search for insect hosts, and (2) a parasitic stage into the insect where bacterial multiplication, nematode reproduction, and production of new IJs occur. Previous studies clearly showed benefits to the association for the nematode during the parasitic stage, but preliminary data suggest the existence of costs to the association for the nematode in free stage. IJs deprived from their bacteria indeed survive longer than symbiotic ones. Here we show that those bacteria-linked costs and benefits lead to a trade-off between fitness traits of the symbiotic nematodes. Indeed IJs mortality positively correlates with their parasitic success in the insect host for symbiotic IJs and not for aposymbiotic ones. Moreover mortality and parasitic success both positively correlate with the number of bacteria carried per IJ, indicating that the trade-off is induced by symbiosis. Finally, the trade-off intensity depends on parental effects and, more generally, is greater under restrictive environmental conditions.

**KEY WORDS:** cost, life-history traits, mutualism, *Steinernema carpocapsae*, symbiosis, *Xenorhabdus nematophila*.

Mutualisms are widespread in nature, concern a wide range of living organisms, appeared several times independently and probably played a major role in the history of life (Bronstein 1994, 2001; Menge 2000). Mutualistic symbioses are commonly defined as long-lasting interspecific associations with reciprocal benefits: the global outcome of the interaction is positive for the two partners. This is classically demonstrated by breaking up the association. There is reciprocal benefit if each partner has higher fitness when associated with the other. This is called proximate response by de Mazancourt et al. (2005) (see Smiley [1986] and Faeth and Sullivan [2003] for experimental evidences). However, even if the global outcome is positive, the association may be costly for one or the two partners because of investment or exploitation (Harder and Barrett 1992; Johnson et al. 1997; de Mazancourt et al. 2005).

For example, competition for a resource produced by one of the partners but exploited by both may lead to conflict of interests between partners (Johnson et al. 1997). Divergent interests can thus arise, leading to mitigated outcomes. In fact long-lasting interspecific interactions range from mutualism to parasitism with all possible intermediates. The global outcome and thus the nature of a particular interaction is sometimes uneasy to assay (Herre et al. 1999) as costs and benefits vary continuously.

These costs and benefits are not necessarily expressed on the same fitness components. An increased investment in symbiosis might therefore have antagonistic consequences, increasing fitness through one of its component but decreasing it through another one. In such a situation, if the investment in symbiosis is variable, we would expect a trade-off between the two fitness

components. This trade-off would be absent in organisms that are deprived from their symbionts. It could thus be considered as a by-product of symbiosis.

Trade-offs between fitness traits are of primary importance in an evolutionary context for two main reasons. First, they constrain the evolution of the symbiosis: as both traits negatively correlate, investment in symbiosis cannot increase indefinitely. This challenges the stability of the association, which can eventually break up. Second, trade-offs can explain the coexistence of contrasting strategies in natural populations (Charnov 1982; Fynn et al. 2005). This may happen at interspecific as well as intraspecific scales with different species/genotypes adopting different solutions along the compensation curve linking both traits.

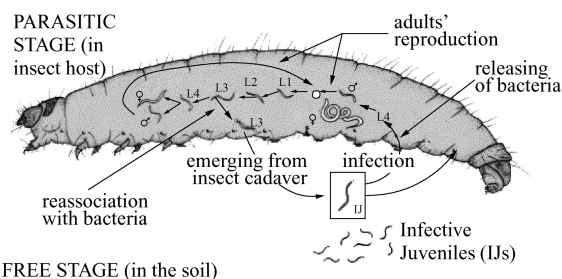
For example, contrasting association types with two opposite reproduction and survival strategies have been described in *Steinernema* entomopathogenic nematodes (Sicard et al. 2003; Emelianoff et al. 2007). *Steinernema* species (Nematoda: Rhabditidae) are entomopathogenic nematodes symbiotically associated with Enterobacteriaceae from the genus *Xenorhabdus*. They are ubiquitous (Hominick 2002) and infest a wide range of insects (Laumond et al. 1979; Poinar 1979). Infective Juveniles (IJs) are soil-dwelling third-stage larvae whose development has been arrested (dauer larvae); they are nonfeeding and carry their bacterial symbionts into a special intestinal organ called vesicle (Bird and Akhurst 1983). After entering an insect host by natural openings, nematodes release their bacterial symbionts into the hemolymph (Fig. 1). Both partners of the symbiosis secrete toxins against insect's immune system and bacteria multiply, provoking septicemia (Goodrich-Blair 2007); all these mechanisms contribute to insect death within 48 h. Nematodes then feed on bacteria and metabolized insect tissues and reproduce into the insect for two or three generations. Newly formed IJs recruit a few bacterial cells in their vesicle, leave the insect cadaver, and disperse in the soil.

Previous studies have shown that both partners benefit from the association. First, *Steinernema* nematodes reproduce more in parasitic stage when associated with their symbiotic bacteria than without (Sicard et al. 2003). On the other hand, bacteria cannot

survive more than a few days in the soil if they are not carried by a nematode (Morgan et al. 1997). The association between *Steinernema* and *Xenorhabdus* therefore matches the classic definition of mutualism. However other works have shown that nematodes survival in free stage is reduced when associated to their symbiotic bacteria (Mitani et al. 2004; Emelianoff et al. 2007). This cost of the association for nematodes is possibly due to a competition between both partners on energetic reserves of nonfeeding IJs (Herbert and Goodrich-Blair 2007).

At the interspecific level these benefits and costs are higher for *Steinernema carpocapsae* nematode, which carries on average 100 bacteria per IJ, than for *S. scapterisci*, which carries on average less than one bacteria per IJ (Sicard et al. 2003; Emelianoff et al. 2007). Suppose now that the number of bacteria carried is variable among individuals within a single species. Then, similarly to what happens at the interspecific scale, one could expect that individual IJs with higher bacterial load reproduce more in parasitic stage and die earlier in free stage than conspecific IJs carrying fewer bacterial cells. Reproduction would therefore be traded off against survival via the number of bacteria they carry.

Although fitness traits have already been compared between symbiotic and aposymbiotic nematodes, the natural variation of these traits and their potential correlation in symbiotic nematodes have never been studied so far. In this work we will use the natural variability of symbiotic load to try to correlate it with other life-history traits of nematodes. *Steinernema carpocapsae* will be chosen as experimental system as it is well studied and exhibits great interindividual variability of bacterial load (50 to 250 bacteria per IJ, Flores-Lara et al. 2007). If our hypothesis is valid, nematodes deprived of their symbionts (hereafter aposymbiotic) should experience weaker or no trade-off at all. We will take advantage of the fact that aposymbiotic IJs can be experimentally produced in *S. carpocapsae* and that they can reproduce in laboratory conditions. We therefore use aposymbiotic IJs as a negative control in our experiment. In both aposymbiotic and symbiotic IJs we will measure reproductive success and mortality, try to correlate these two fitness traits to the number of carried bacteria and test for the existence of a trade-off.



**Figure 1.** Life cycle of *Steinernema-Xenorhabdus* symbioses (drawing kindly provided by N. Le Brun).

## Materials and methods

### BIOLOGICAL MATERIAL

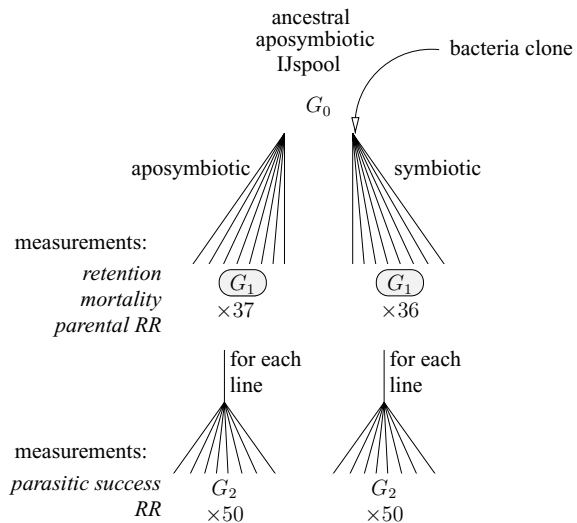
IJs of *S. carpocapsae* strain SK27 (Plougastel, Brittany, France) and their native bacterial symbiont, *Xenorhabdus nematophila* strain F1 are both available in the laboratory. IJs can be kept alive during a couple of months at 8°C in the dark. Bacteria can be separately stored in 15% glycerol at -80°C. The parasitic cycle of the association can be performed in laboratory conditions using *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) as an experimental insect host. *Galleria mellonella* has been chosen because it is

highly permissive to entomopathogenic nematodes, thus reducing the risk of confounding effects due to host resistance.

As mentioned above, we will use aposymbiotic IJs as control. To obtain those, symbiotic IJs have been experimentally deprived of their bacteria as explained by Sicard et al. (2003). The association *S. carpocapsae* SK27-*X. nematophila* F1 has been kept for 25 years in the laboratory. It is therefore well adapted to laboratory conditions. This suppresses the risk of confounding effects due to maladaptation and response to selection that have already been observed in *Steinernema feltiae* strains recently sampled from wild populations. Nematodes have been maintained by successive experimental infections of *G. mellonella* last instar larvae. This maintenance method provokes a genetic bottleneck for nematodes at each generation. Genetic polymorphism is thus probably very weak in our nematode pool. This means that the phenotypic variance we will measure can be considered as resulting from phenotypic plasticity.

#### EXPERIMENTAL DESIGN

In this experiment we compared the relation between the mortality and reproduction of nematodes that carry bacteria (symbiotic) and others that do not (aposymbiotic). All the nematodes we used to run both symbiotic and aposymbiotic treatments originate from the same ancestral pool of aposymbiotic individuals. Nematodes of the symbiotic treatment were obtained by reassociating ancestral aposymbiotic nematodes to bacteria from a single ancestral clone. Indeed, as we use aposymbiotic IJs as a control in this experiment, it is crucial that the unique difference between apo- and symbiotic treatments is the presence of bacteria in nematodes. From these ancestral nematodes (generation  $G_0$ ) we derived 36 lines for each treatment (Fig. 2). Each of these lines was made of the offspring of a single infection. All the life-history traits we studied were then measured on this first generation of nematodes (hereafter  $G_1$ ), which was thus the focal generation of our experiment. Details on the methods used to construct the  $G_1$  lines and to estimate their traits are given in the following sections. For each  $G_1$  line we measured the average number of bacteria carried by a nematode (hereafter named retention) and tried to relate this quantity to the IJs mortality and to their reproductive success. Reproductive success was estimated by initiating 50 new infections for each  $G_1$  line, which therefore constitute a second generation of nematodes (hereafter  $G_2$ ). The proportion of successful  $G_2$  infections is the parasitic success of the  $G_1$  line from which they were initiated; the average number of nematodes produced by a successful  $G_2$  infection is the reproductive rate (RR) of the corresponding  $G_1$  line. In addition to these measurements, we took into account parental influences on  $G_1$  individuals by estimating their parents' fitness. RR of the parents of  $G_1$  lines, that is, of the  $G_0$  individuals that were used to build these  $G_1$  lines, was chosen as an estimation of their fitness (Fig. 2).



**Figure 2.** Experimental design and life-history traits of  $G_1$  nematodes. RR, reproductive rate. Parasitic success of  $G_1$  lines is the proportion of infections that  $G_1$  IJs achieve as parents, that is, the proportion of successful  $G_2$  infections among the 50 we made for each  $G_1$  line. Parasitic success of each  $G_1$  line was thus measured on generation  $G_2$ . Similarly, RR of  $G_1$  lines is the offspring number they produce as parents, that is, the average number of  $G_2$  individuals per line. Thus it was also counted on generation  $G_2$ . Parental RR of  $G_1$  lines, that is, RR of  $G_0$  nematodes, is the number of  $G_1$  individuals in each line, and was thus counted on generation  $G_1$ .

#### OBTENTION OF LINES BY EXPERIMENTAL INFECTIONS AND REASSOCIATION WITH BACTERIA

To realize an infection, 20 aposymbiotic IJs from the ancestral pool ( $G_0$ ) were deposited in a 1.5-mL microtube containing a piece of filter paper. A *Galleria* larva was then introduced in each microtube and the nematodes and the insect were incubated together at 24°C for 72 h. Cadavers were then placed into "White traps" (White 1927) so that newly emerging IJs ( $G_1$ ) escape from the insect and migrate to the water of the trap in which they were easy to collect.

To experimentally reassociate aposymbiotic nematodes with their bacterial symbionts, we injected 20  $\mu$ l of a bacterial suspension (about 2000 bacterial cells), prepared following Sicard (2003), into the *Galleria* larvae we infected with nematodes 24 h earlier. These insects were then re-incubated at 24°C. After 24 h they were all dead and placed into White traps at 24°C.

One week postinfection those 72 White traps (i.e., the 36 infections for each treatment) were observed daily to check emergence of IJs. Newly emerged IJs ( $G_1$ ) were collected for further measurements five days after the first observation of IJs in the water. This was done to limit the time IJs spend at 24°C, which could

affect further measurements. The collected nematodes were then kept at 8°C in cell culture flasks and the White traps were filled again with clean water and put at 24°C for five further weeks at least to collect all the IJs that emerge later.

### LIFE-HISTORY TRAITS MEASUREMENTS

#### *Mortality measurement*

For each line of the two treatments, death rate was measured on  $G_1$  IJs. Dead and alive IJs were distinguished on the basis of their morphology. Dead IJs have a typically curved and granular appearance and do not respond to a tactile stimulus (Mitani et al. 2004; Emelianoff et al. 2007). For each line 1200  $G_1$  IJs were placed into a grid-drawn petri dish one week after their collection. The first count of alive and dead IJs was made. Petri dishes were then placed at 24°C and further counts on the same dish were made 8, 12, and 16 weeks after the initial measurement. From these measures the proportion of survivors ( $P_i$ ) was calculated at each time  $i$  and a death rate was estimated using linear regression of  $\log(P_i)$  as a function of time.

#### *Retention measurement*

To evaluate the number of bacteria carried per IJ, three independent pools of 500 IJs were taken from each  $G_1$  line 13 days at most after they were collected. Each pool was then disinfected, rinsed, and the 500 IJs it contained were crushed together to liberate bacterial symbionts following the method of Sicard et al. (2003). A 100  $\mu$ l of the 1/100 diluted suspension was then streaked onto NBTA plates (31 g Nutrient Agar, 2.5 mg Bromothymol Blue, 1 L sterile H<sub>2</sub>O) supplemented with 0.0025 % (w/v) Triphenyl Tetrazolium Chloride (three dishes per replicate) and incubated at 28°C for 48 h. For each pool the number of bacteria per IJ was estimated by counting colony forming units (CFU) on each dish and using the mean of the three dishes counts. Retention for each line is the average of the three 500-IJs pools.

#### *Reproduction measurements*

To evaluate the parasitic success of each  $G_1$  line, 50  $G_2$  infections were produced for each  $G_1$  line.  $G_2$  infections were obtained as described above, that is, using 20 IJs per infected *Galleria*. After their death, *Galleria* were placed into White traps and the emergence of IJs ( $G_2$ ) was checked after 14 and 28 days at 24°C. For each date the parasitic success is the percentage of successful infections, that is, infections leading to emergence of 10 IJs at least.

To evaluate the RR five successful  $G_2$  infections were randomly chosen. Total number of IJs from each infection was estimated by counting IJs under binocular microscope on a grid drawn on a petri dish. The mean of the five samples was taken as measurement of the mean RR of the line.

These two reproduction measurements were replicated on another set of  $G_2$  infections that was initiated two months later

with 8 IJs per *Galleria* instead of 20 in the previous set of measurements. The IJs we used for this measurement were kept at 8°C during these two months whereas those used for the first measurement were not. As this storage period can affect bacterial load (Flores-Lara et al. 2007), we measured retention again at the same time when we initiated the second set of  $G_2$  infections. As analyses using the second-retention measurement yielded similar conclusions than those using the first-retention measurement, we only present the latter in following sections.

#### *Parental reproductive rate*

Parental RR corresponds to RR of  $G_0$  individuals that served to produce the 72  $G_1$  lines. It is estimated as the total number of  $G_1$  IJs in each of the 72 lines. For each line it includes the number of IJs initially collected in the cell culture flasks at 8°C plus the IJs later emitted by the insect cadaver in the 'White trap' at 24°C. Nematodes were counted two months after infections, as explained above.

### STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using R statistical software (Team 2006). Parasitic success were analyzed using a general linear model assuming binomial distribution for residuals (logistic regression). A Cauchy link function was chosen because it proved to best fit our data. Effects were tested using a chi-square distribution. RR was analyzed using linear regression. Death rates were log transformed and analyzed using a linear model.

## Results

### EFFECT OF RETENTION ON REPRODUCTION COMPONENTS

We analyzed parasitic success using a generalized linear model assuming binomial distribution of residuals, which includes parental RR, retention, and their interaction as explanatory variables. We found that the parasitic success is influenced by a negative interaction between parental RR and retention (Table 1A). This interaction means that the effect of retention on parasitic success differs between nematodes whose parents had a high RR and those whose parents had a low RR. Because of this negative interaction between parental RR and retention, the analysis of simple effects should be considered with caution. We therefore analyzed infections with high (prolific lines) and low (unprolific lines) parental RR separately. Prolific lines come from parents with RR above the median parental RR; unprolific lines come from parents with RR below the median parental RR. We did not detect any effect of the explanatory variables on the parasitic success in prolific lines (Table 1B). On the opposite, simple effects of parental RR and retention are detected in unprolific ones, the latter being very strong (see Fig. 3A and Table 1C): parasitic success increases with

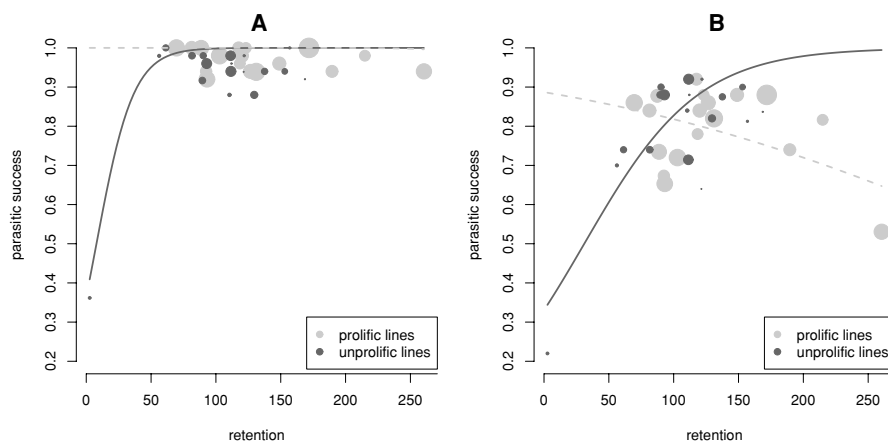
**Table 1.** Effects of parental reproductive rate and retention on parasitic success with 20 and 8 IJs. Results are from an analysis of variance (ANOVA) using a generalized linear model: (A) Global analysis, (B) Prolific lines only, (C) Unprolific lines only. Degrees of freedom are the same for all infection conditions. df = degrees of freedom. \*This effect is lost when the lowest retention line is omitted. †This effect is lost when the highest retention line is omitted. P-values significant at the alpha = 0.05 level are in bold.

Source	df	20 IJs				8 IJs			
		day 14		day 28		day 14		day 28	
		Deviance	P	Deviance	P	Deviance	P	Deviance	P
<b>A. Global</b>									
Parental RR	1	28.018	<0.0001*	31.430	<0.0001*	1.331	0.249	2.893	0.089
Retention	1	86.818	<0.0001*	95.832	<0.0001*	30.704	<0.0001*	67.119	<0.0001*
Parental RR × retention	1	9.359	<b>0.002*</b>	4.629	<b>0.031*</b>	48.089	<0.0001	26.898	<0.0001*
Residuals	33	63.581		41.690		90.765		71.744	
<b>B. Prolific lines</b>									
Parental RR	1	0.0120	0.9129	0.0609	0.8051	0.326	0.568	0.741	0.389
Retention	1	1.9867	0.1587	0.8805	0.3481	6.025	<b>0.014†</b>	1.229	0.268
Parental RR × retention	1	0.0337	0.8544	0.6184	0.4316	0.474	0.491	0.129	0.719
Residuals	15	29.3111		19.6815		44.840		31.928	
<b>C. Unprolific lines</b>									
Parental RR	1	6.386	<b>0.012*</b>	12.208	<b>0.0005*</b>	9.232	<b>0.002*</b>	7.017	<b>0.008*</b>
Retention	1	88.730	<0.0001*	98.135	<0.0001*	74.263	<0.0001	94.031	<0.0001
Parental RR × retention	1	11.063	<b>0.001*</b>	1.425	0.233	0.153	0.696	0.000	0.988
Residuals	14	25.679		20.578		35.569		32.686	

retention in unprolific lines. However this effect is mainly due to a unique unprolific line with low retention (2.6 bacteria per IJ) and low parasitic success (40%): it is lost when this extreme line is omitted.

To test if the effect of retention on parasitic success depends on environmental factors we used more restrictive infection conditions. To this purpose we reestimated parasitic success following

the design previously explained but using 8 IJs instead of 20 to infect *Galleria* and produce generation  $G_2$ . Here again we analyzed prolific and unprolific lines separately because of a strong interaction between parental RR and retention (Table 1A). Under these more restrictive infection conditions, retention has an unexpected negative effect on parasitic success of prolific lines at day 14 (see Table 1B and Fig. 3B). However this effect is only due to a



**Figure 3.** Parasitic success (day 14) of symbiotic nematodes as a function of their retention. (A) 20 IJs' infections; (B) 8 IJs' infections. Each point corresponds to a line and the logistic regression curve is represented for each of the two types of lines. Diameter of the points is proportional to parental reproductive rate.

unique line with very high retention (260 bacteria per IJ) and low parasitic success (53 %) : it disappears when this line is omitted. This effect also disappears at day 28 (Table 1B). For unprolific lines parasitic success is positively linked with retention at day 14 as well as at day 28 (Table 1C). More importantly this effect persists even when omitting the low-retention line (chi-square,  $df = 15$ ,  $P = 0.009$  and  $P = 0.033$  at day 14 and 28, respectively).

The negative interaction between retention and parental RR can be better understood by introducing a quadratic effect of retention in the previous model. When this is done, the interaction between parental RR and retention is no longer significant (Table 2). Additionally, we found a significant quadratic effect of retention on parasitic success each time the interaction between parental RR and retention was significant in the previous analysis (20 IJs' parasitic success: chi-square,  $df=33$ ,  $P = 0.001$  at day 14 and  $P = 0.007$  at day 28). The linear effect of retention, when present, is maintained in these analyses (20 IJs' parasitic success: chi-square,  $df=34$ ,  $P < 0.0001$  at both dates). These two explanatory variables, parental RR by retention interaction and quadratic effect of retention, therefore probably explain the same part of the total variation.

The linear effect of retention is positive whereas its quadratic effect is negative. This means that parasitic success increases with retention up to a threshold above which it levels off or even decreases. This could produce an interaction between parental RR and retention when the quadratic effect is ignored if retention is lower in unprolific lines than in prolific ones. The effect of retention would indeed be stronger in unprolific, low-retention, lines than in prolific, high-retention, ones. Prolific lines effectively tend to carry more bacteria than unprolific ones (on average 128 and 106 bacteria per IJ, respectively) but the difference is not significant (Student's  $t = 1.5134$ ,  $df=34.196$ ,  $P = 0.1394$ ).

None of the factors was found to have a significant effect on RR, for both 20 IJs and 8 IJs infections and whether or not the extreme line is included. The number of bacteria a nematode carries therefore seems to determinate its ability to infect an insect, but not the number of offspring it produces. This conclusion holds, of course, when analyzing the RR of symbiotic IJs alone, in which retention varies from 2.6 to 260.4 bacteria. If aposymbiotic IJs are included in the analysis, we find a significant effect of retention on RR as aposymbiotic IJs produce fewer IJs than symbiotic ones (Fisher,  $F_{1,70} = 388.04$ ,  $P < 0.0001$  and  $F_{1,72} = 367.6$ ,  $P < 0.0001$  with 20 and 8 IJs, respectively). Once the infection is successfully initiated, a very small initial number of bacteria is sufficient to improve nematodes' RR.

#### EFFECT OF RETENTION ON MORTALITY

A linear model explaining mortality with parental RR, retention, and their interaction was used here. Because of a significant neg-

ative interaction between retention and parental RR, we analyzed prolific and unprolific lines separately as explained above (see Table 3 and Fig. 4). For prolific lines we did not detect any significant effect in this model. Conversely, retention has a significant positive effect on death rate in unprolific lines (Table 3), even when the lowest retention line is omitted (Fisher,  $F_{1,14} = 7.9104$ ,  $P = 0.01383$  in this latter case).

#### ANALYSIS OF CORRELATIONS BETWEEN REPRODUCTION COMPONENTS AND SURVIVAL

Here we analyzed parasitic success using a generalized linear model to explain parasitic success as a function of parental RR, log-transformed death rate, and their interaction. We detected a positive effect of death rate on 20 IJs parasitic success only when the lowest retention line was included. We found strong and robust effects of death rate on 8 IJs parasitic success.

Parasitic success with 8 IJs is affected by a negative interaction between parental RR and death rate at day 14 as well as at day 28 and whether or not the extreme line is included. We therefore analyzed prolific and unprolific lines separately. On prolific lines we did not detect any significant effect at any date. On the contrary, we detected a positive effect of death rate on unprolific lines at day 14 (see Table 4A and Fig. 5A) even when omitting the lower retention line (chi-square,  $df=15$ ,  $P = 0.012$ ). At day 28 death rate has a positive effect on parasitic success (see Table 4B and Fig. 5B) but it only relies on this extreme line.

The positive relation between death rate and parasitic success of unprolific lines is lost when introducing retention prior to death rate in the model at both dates (Table 4C; day 28: chi-square,  $df=14$ ,  $P = 0.540$ ). Moreover the effect of retention is highly significant for both dates (chi-square,  $df=15$ ,  $P < 0.0001$ ). This suggests that the part of the variance explained by death rate could also be almost fully explained by retention. The results on aposymbiotic nematodes confirm this: the relation between parasitic success and death rate is negative (chi-square,  $df=33$ ,  $P = 0.049$ ) (Fig. 5B) and is lost when one single line with extremely low death rate is omitted.

To clarify the negative interaction between parental RR and death rate, we introduced a quadratic effect of death rate in the model explaining parasitic success with parental RR and death rate as done in the first section of Results. However the situation seems more complex than previously. Indeed a significant quadratic effect (of death rate) is also detected but this time, including a quadratic effect of mortality is not sufficient to make the interaction term not significant.

We do not detect any effect of death rate on RR neither with 20 IJs nor with 8 IJs, which is consistent with the absence of effect of retention on RR. This is also the case for aposymbiotic nematodes.

**Table 2.** Effects of parental reproductive rate, linear and quadratic effects of retention on 8 IJs' parasitic success. Results are from an ANOVA using a generalized linear model. df, degrees of freedom. \*This effect is lost when the lowest retention line is omitted. *P*-values significant at the  $\alpha = 0.05$  level are in bold.

Source	df	day 14		day 28	
		Deviance	<i>P</i>	Deviance	<i>P</i>
Parental RR	1	1.331	0.249	2.893	0.089
Retention (linear)	1	30.704	< <b>0.0001</b> *	67.119	< <b>0.0001</b> *
Retention <sup>2</sup> (quadratic)	1	71.309	< <b>0.0001</b>	43.551	< <b>0.0001</b>
Parental RR $\times$ retention	1	0.010	0.920	0.017	0.897
Parental RR $\times$ retention <sup>2</sup>	1	0.648	0.421	1.106	0.293
Residuals	31	66.887		53.968	

## Discussion

### SURVIVAL TRADE-OFF AGAINST REPRODUCTION IN SYMBIOTIC NEMATODES

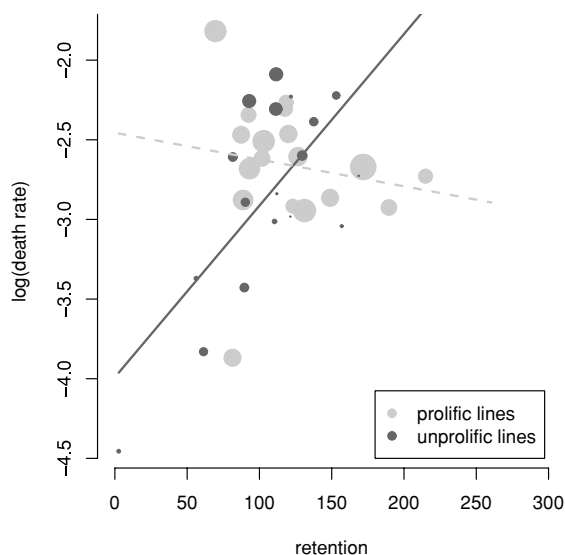
We found a positive relation between unprolific nematodes' parasitic success (i.e., reproduction) and death rate (see Table 4 and Fig. 5). Nematodes cannot maximize these two fitness components at the same time: they either invest more resources in survival at the expense of reproduction, or invest more in reproduction to the detriment of survival. Despite difficulties to detect them, numerous studies have suggested the existence of such survival–reproduction trade-offs in a wide range of organisms: angiosperms (Rohmeder 1967), mammals (Clutton-Brock et al. 1982), amphib-

ians (Tuttle and Ryan 1981), birds (Dhondt 2001), fish (Winkelman 1996), insects (Partridge and Farquhar 1981; Kriegsbaum 1988; Ellers 1996), rotifers (Snell and King 1977), viruses (de Paepe and Taddei 2006). Thus negative correlation between survival and reproduction seems rather frequent in nature. Another study on entomopathogenic nematodes found a trade-off between infection rate (i.e., installation of adult nematodes into the insect) and IJ longevity in *S. feltiae* (Crossan et al. 2007).

The novelty of our work is to relate this trade-off to the symbiotic state of the considered organism. In our study, the positive mortality–reproduction correlation is the result of two positive correlations: between retention and parasitic success on one hand, and between retention and mortality on the other. Furthermore this positive mortality–reproduction correlation is found in symbiotic individuals but not in aposymbiotic ones. These results support the idea that the trade-off between nematodes' fitness traits is linked to, and probably induced by, their symbiotic association with bacteria. This makes clear that symbiotic associations have strong consequences on partners' life-history traits and response to environment. Crossan et al. (2007), in their study on *S. feltiae*, did not mention the symbiotic association of this nematode species with *Xenorhabdus bovienii* bacteria (Boemare et al. 1997) or relate their results to the symbiosis. We cannot directly compare our experiment to theirs as they used selected lines and thus showed a genetic trade-off, whereas we only have the phenotypic part of the trade-off. Nevertheless, as our work shows that symbiotic bacteria modify nematode fitness traits, it would have been interesting to know how the symbiotic status, and potentially the retention of nematodes changed over the course of selection.

### THE INTENSITY OF THE TRADE-OFF DEPENDS ON ENVIRONMENTAL EFFECTS

Both benefit (parasitic success) and cost (mortality) of carrying bacteria are affected by parental influences. Indeed the positive effects of retention on parasitic success and death rate are only detected for unprolific lines, that is, lines coming from parents



**Figure 4.** Log-transformed death rate of symbiotic nematodes as a function of their retention. Each point corresponds to a line and the linear regression curve is represented for each of the two types of lines. Diameter of the points is proportional to parental reproductive rate.

**Table 3.** Effects of parental reproductive rate and retention on log-transformed death rate. Results are from an ANOVA using a linear model: A. Global analysis, B. Unprolific lines only. *P*-values significant at the alpha = 0.05 level are in bold.

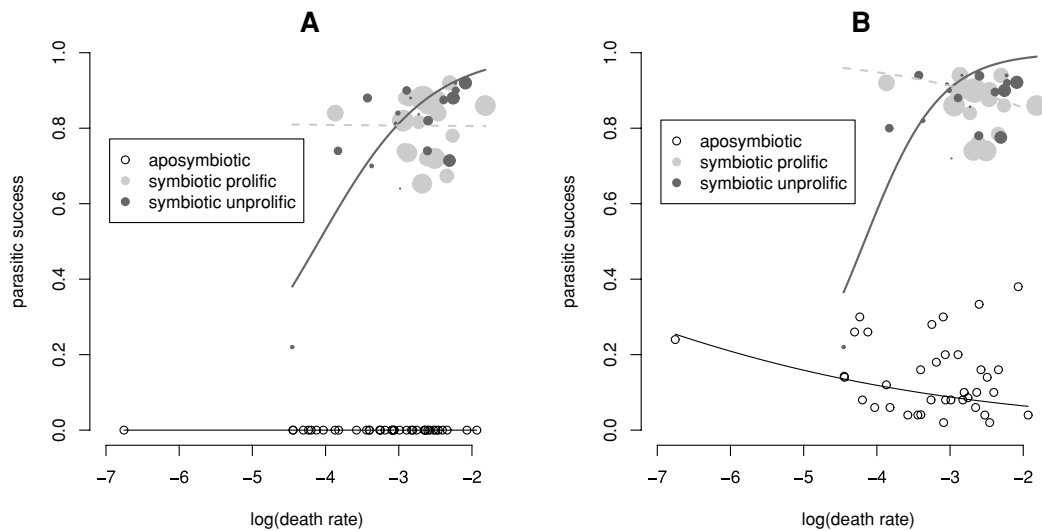
Source	df	SS	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
A. Global					
Parental RR	1	0.41129	0.41129	4.3639	<b>0.0447*</b>
Retention	1	0.61786	0.61786	6.5557	<b>0.0154*</b>
Parental RR × retention	1	0.95114	0.95114	10.0920	<b>0.0033</b>
Residuals	32	3.01591	0.09425		
B. Unprolific lines					
Parental RR	1	0.52331	0.52331	7.4985	<b>0.0160*</b>
Retention	1	1.83303	1.83303	26.2654	<b>0.0002</b>
Parental RR × retention	1	0.02752	0.02752	0.3943	0.5402
Residuals	14	0.97704	0.06979		

df, degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, mean square. \*This effect is lost when the lowest retention line is omitted.

with poor RR. As genetic polymorphism of both nematode and bacteria pools is weak, the (parental) RR variability is likely to be mainly environmental. Poor parental RR could denote suboptimal infection progress and affect nematode health. Nematode physical condition thus interplays with the advantage they retire from the symbiosis: the benefit of being associated results from an interaction between both partners. Moreover their physical condition also partially determines the cost they pay in free stage: the eventual better physical condition of prolific lines would be consistent with the undetectable cost (mortality) of high retention for these lines. Our results therefore suggest that the environmental conditions at birth determine to which extent nematodes will benefit from, and

pay-off for, the association with bacteria, and thus to which extent they will experience the trade-off.

More generally, the effects of retention on parasitic success and mortality are stronger in less-favorable conditions, and so is the trade-off. Indeed these effects are more robust with 8 IJs than with 20 IJs infections. Moreover they are greater at day 14 than at day 28. Finally the cost in free stage is detected at 24°C but not at 8°C (data not shown). Infesting with many IJs and having time to emerge from host's cadaver can be considered as nonlimitative experimental conditions. On the opposite, limited number of IJs, short-timing, and high temperature may act as restrictive conditions that make the trade-off easier to



**Figure 5.** Eight IJs parasitic success of nematodes at day 14 (A) and day 28 (B) as a function of their (log-transformed) death rate. Each point corresponds to a line and the logistic regression curves are represented. For symbiotic lines, diameter of the points is proportional to parental reproductive rate.



detect. These variations in trade-off strength are consistent with previous studies showing that negative correlations between fitness components are harder to detect in favorable conditions (de Laguérie et al. 1993; Tinbergen et al. 1985).

In the wild, unfavorable conditions for nemato-bacterial associations consist in low insect hosts density for example. Alternatively, available hosts can be small sized or have strong immune defenses. Thus the differential trade-off strength we observed in this experiment could also occur in the field, with various environments eventually selecting for contrasting survival–reproduction strategies.

#### UNDERLYING MECHANISMS: EFFECT OF SYMBIOTIC LOAD ON FITNESS TRAITS

The 36 lines we studied varied greatly in terms of the number of bacteria they carry. This number ranges from 2.6 to 260 bacteria per IJ according to the line. This variation is probably the cause of the trade-off that we detected.

We indeed found that symbiotic nematodes that carry many bacteria face higher mortality than those that carry few. This is consistent with the fact that symbiotic nematodes face higher mortality than aposymbiotic ones (Student's,  $t = 2.846$ ,  $df=71.991$ ,  $P = 0.0058$ , see also Mitani et al. [2004] and Emelianoff et al. [2007]). Underlying mechanisms are yet unknown but several hypotheses are plausible. The cost for the nematodes could be due to

bacterial toxins secreted into the vesicle and/or defense cost of nematodes against bacteria, but there is no evidence in favor of these hypotheses until now. A competition for nutrients between bacteria and nematodes would be an alternative explanation. Indeed IJs do not feed at all during the free stage (Poinar and Leutenegger 1968) but the bacteria they carry in their intestine multiply slowly (Martens et al. 2003; Sicard 2003; Sicard et al. 2004). The nutrients required for this growth should thus be deducted from the total IJs' reserves in proportion to the number of bacteria carried. Thus, the more bacteria nematodes carry, the less reserves they would have left to survive, and so the higher the cost they would pay in free stage.

We also found that parasitic success increases with retention in unprolific lines. This is to our knowledge the first report of benefits increasing with the amount of symbionts in a mutualistic association. This is consistent with the fact that aposymbiotic nematodes succeed in infecting insects five to six times less often than symbiotic ones (20 IJs' parasitic success: 15% against 97% for symbiotic nematodes, 8 IJs' parasitic success: 14% instead of 85%, chi-square,  $df = 70$ ,  $P < 0.0001$  in both cases). This benefit of carrying bacteria is detectable on parasitic success, that is, the proportion of successful infections, but not on RR, that is, the number of emitted IJs. Succeeding in infecting an host requires that IJs penetrate, install into host, overwhelm its immune system, and start reproducing. Bacteria therefore seem to play a positive role in these early steps of infection. This is consistent with the fact that *Galleria* are killed in 60 h or more by aposymbiotic nematodes, whereas symbiotic ones kill them in 48 h only. Additionally the benefit of carrying bacteria is stronger when parasitic success is measured at day 14 than later on (see Table 1). Conversely, emitting many offspring requires that nematodes exploit efficiently the resources provided by the host, which does not seem to be affected much by the number of bacteria initially introduced into the host (even though nematodes' life cycle seem to be accelerated in the presence of bacteria: first release of offspring 17 days after infection instead of 12 for symbiotic IJs, Fisher,  $F_{1,70} = 57.377$ ,  $P < 0.0001$ ).

An additional argument supports the hypothesis of the importance of bacteria in the early stages of the infective process. Symbiotic IJs almost always succeed in infecting when 20 IJs are put in contact with a *Galleria*; parasitic success is weaker when only 8 IJs are used. This is a dose effect, and this effect is much weaker in aposymbiotic than in symbiotic nematodes. The dose that matters here seems therefore to be the dose of bacteria, rather than the dose of nematodes. This difference is actually accentuated in our experiment by the drop of retention during the two months separating 20 IJs and 8 IJs infections, consistently with Flores-Lara et al. (2007). It would be interesting to test this dose effect on earlier steps of lifecycle (e.g., killing of the insect, bacterial overrunning of insect cadaver) and to relate it to action scale of pathogenic molecules as suggested in Schmid-Hempel and Frank (2007).

**Table 4.** ANOVA table for generalized linear model of 8 IJs' parasitic success of unprolific lines as a function of parental reproductive rate and log-transformed death rate: (A) day 14, (B) day 28, and (C) day 14, model including retention prior to death rate. df, degrees of freedom. \*This effect is lost when the lowest retention line is omitted. P-values significant at the alpha = 0.05 level are in bold.

Source	df	Deviance	P
A. day 14			
Parental RR	1	9.232	<b>0.002*</b>
Log(death rate)	1	72.231	<b>&lt;0.0001</b>
parental RR $\times$ log(death rate)	1	12.879	<b>&lt;0.0001</b>
Residuals	14	24.874	
B. day 28			
Parental RR	1	7.017	<b>0.008*</b>
Log(death rate)	1	87.662	<b>&lt;0.0001*</b>
Parental RR $\times$ log(death rate)	1	12.066	<b>0.001*</b>
Residuals	14	26.989	
C. day 14, including retention			
Parental RR	1	9.232	<b>0.002*</b>
Retention	1	74.263	<b>&lt;0.0001</b>
Log(death rate)	1	2.392	0.122
Parental RR $\times$ retention	1	1.059	0.303
Parental RR $\times$ log(death rate)	1	8.102	<b>0.004</b>
Residuals	12	24.168	

## Conclusion

We showed that entomopathogenic nematodes endure a survival–reproduction trade-off linked to the presence of their bacterial symbionts, and that the intensity of the trade-off depends on environmental effects. Genetic variability of nematode pool was small enough to consider that we controlled for it, thus the observed variability of traits is due to phenotypic plasticity. This phenotypic trade-off implies underlying physiological constraints on symbiosis investment. As far as genetic determinism of key life-history traits is not yet shown, exact evolutive consequences of this trade-off remain unknown. Further experiments are needed to test if there is a genetic component in the determinism of those traits. In particular, if genetic variability is detected on retention, we would expect from our results that retention correlates positively to parasitic success and mortality between genotypes, resulting in a genetic trade-off.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by French Ministère de la Recherche (contribution no. ISEM 2007-153). We thank S. Pagès, S. Euzet-Sicard, B. Alric, C. Simon, and G. Simoncelli for their technical support; and B. Godelle and M. Sicard for helpful comments on this work.

## LITERATURE CITED

- Bird, A. F., and R. Akhurst. 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int. J. Parasitol.* 13:599–606.
- Boemare, N., A. Givaudan, M. Brehélin, and C. Laumond. 1997. Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. *Symbiosis* 22:21–45.
- Bronstein, J. L. 1994. Our current understanding of mutualism. *Q. Rev. Biol.* 69:31–51.
- . 2001. The costs of mutualism. *Am. Zool.* 41:825–839.
- Charnov, E. L. 1982. *The theory of sex allocation*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Clutton-Brock, T. H., F. E. Guinness, and S. D. Albon. 1982. *Red deer: behavior and ecology of two sexes*. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Crossan, J., S. Paterson, and A. Fenton. 2007. Host availability and the evolution of parasite life-history strategies. *Evolution* 61:675–684.
- de Laguérie, P., I. Olivieri, and P. H. Gouyon. 1993. Environmental effects on fitness-sets shape and evolutionarily stable strategies. *J. Theor. Biol.* 163:113–125.
- de Mazancourt, C., M. Loreau and U. Dieckmann. 2005. Understanding mutualisms when there is adaptation to the partner. *J. Ecol.* 93:305–314.
- de Paepe, and M., F. Taddei. 2006. Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLOS Biology* 4:e193–e193.
- Dhondt, A. A. 2001. Trade-offs between reproduction and survival in Tits. *Ardea* 89:155–166.
- Ellers, J. 1996. Fat and eggs: an alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Nether. J. Zool.* 46:227–235.
- Emelianoff, V., M. Sicard, N. Le Brun, C. Moulià, and J. B. Ferdy. 2007. Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. *Parasitol. Res.* 100:657–659.
- Faeth, S. H., and T. J. Sullivan. 2003. Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *Am. Nat.* 161:310–325.
- Flores-Lara, Y., D. Rennecker, S. Forst, H. Goodrich-Blair, and P. Stock. 2007. Influence of nematode age and culture conditions on morphological and physiological parameters in the bacterial vesicle of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *J. Invertebrate Pathol.* 95:110–118.
- Fynn, R. W. S., C. D. Morris, and K. P. Kirkman. 2005. Plant strategies and trait trade-offs influence trends in competitive ability along gradients of soil fertility and disturbance. *J. Ecol.* 93:384–394.
- Goodrich-Blair, H. 2007. They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila*–*Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:225–230.
- Harder L. D., and S. C. H. Barrett. 1992. The energy cost of bee pollination for *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Funct. Ecol.* 6:226–233.
- Herbert E. E., and H. Goodrich-Blair. 2007. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.*:534–646.
- Herre, E. A., N. Knowlton, U. G. Mueller, and S. A. Rehner. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* 14:49–53.
- Hominick, W. M. 2002. *Biogeography*, Pp. 115–143 in R. Gaugler, ed. *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing, Wallingford, U.K..
- Johnson, N. C., J. H. Graham, and F. A. Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.* 135:575–586.
- Kriegsbaum, H. 1988. *Untersuchungen zur "Lebensgeschichte" von Feldhäuschrecken (Acrididae, Gomphocerinae): Fortpflanzungsstrategie und akustisches Verhalten im natürlichen Habitat*. Ph.D. thesis, Univ. of Erlangen.
- Laumond, C., H. Mauléon, and A. Kermarrec. 1979. Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nématode entomophage *Neoplectana carpocapsae*. *Entomophaga* 24:13–27.
- Martens, E. C., K. Heungens, and H. Goodrich-Blair. 2003. Early colonisation events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *J. Bacteriol.* 185:3147–3154.
- Menge, B. A. 2000. Testing the relative importance of positive and negative effects on community structure. *Trends Ecol. Evol.* 15:46–47.
- Mitani, D. K., H. K. Kaya, and H. Goodrich-Blair. 2004. Comparative study of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, reared on mutant and wild-type *Xenorhabdus nematophila*. *Biol. Control* 29:382–391.
- Morgan, J. A., V. Kuntzelmann, S. Taverno, M. A. Ousley, and C. Winstanley. 1997. Survival of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* in water and soil. *J. Appl. Microbiol.* 83:665–670.
- Partridge L., and M. Farquhar. 1981. Sexual activity reduces lifespan of male fruitflies. *Nature* 294:580–582.
- Poinar, G. O. 1979. *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poinar G. O., and R. Leutenegger. 1968. Anatomy of the infective and normal third-stage juveniles of *Neoplectana carpocapsae* Weier (Steinernematidae: Nematoda). *J. Parasitol.* 54:340–350.
- Rohmeder, E. 1967. Beziehungen zwischen Frucht- bzw. Samenerzeugung und Holzzerzeugung der Waldbäume. *Allg. Forstzeitscr.* 22:33–39.
- Schmid-Hempel P., and S. A. Frank. 2007. Pathogenesis, virulence and infective dose. *PLoS Pathogens* 3:e147–e147.

- Sicard, M., 2003. Modalités écologiques et évolutives des interactions entre les nématodes entomopathogènes *Steinemema* et leurs symbiotes bactériens *Xenorhabdus*. Ph.D. thesis, Université Montpellier 2.
- Sicard, M., N. Le Brun, S. Pagès, B. Godelle, N. Boemare, and C. Moulia. 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitol. Res.* 91:520–524.
- Sicard, M., K. Brugirard-Ricaud, S. Pagès, A. Lanois, N. Boemare, M. Brehélin, and A. Givaudan. 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6473–6480.
- Smiley, J. 1986. Ant constancy at passiflora extrafloral nectarines—effects on caterpillar survival. *Ecology* 67:516–521.
- Snell T. W., and C. E. King. 1977. Lifespan and fecundity patterns in rotifers: the cost of reproduction. *Evolution* 31:882–890.
- Team, R. D. C. 2006. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org>.
- Tinbergen, J. M., J. H. van Balen, and H. M. van Eck. 1985. Density dependant survival in an isolated Great Tit population—Kluyvers data reanalyzed. *Ardea* 73:38–48.
- Tuttle, M. D., and M. J. Ryan. 1981. Bat predation and the evolution of frog vocalizations in the Neotropics. *Science* 214:677–678.
- White, G. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science* 66:302–303.
- Winkelman, D. L. 1996. Reproduction under predatory threat: trade-offs between nest guarding and predator avoidance in male dollar sunfish (*Lepomis marginatus*). *Copeia* 4:845–851.

Associate Editor: J. Koella

# **Interlude**

De nombreuses études ont mis en évidence les bénéfices à l'association dans les mutualismes. En revanche, la détection des coûts est beaucoup plus difficile car ils sont masqués par le bilan global de l'interaction, positif pour chaque partenaire. Quelques travaux expérimentaux ont montré l'existence de tels coûts : coût en carbone des champignons mycorhiziens (Johnson et al. 1997), coût en nectar (Harder and Barrett 1992) ou en graines (Janzen 1979) des pollinisateurs. Quant à l'exploration des compromis, très étudiés dans les interactions hôtes-pathogènes<sup>1</sup>, elle en est pour le moment à ses balbutiements dans les mutualismes. À ma connaissance, une seule étude, impliquant la symbiose plante-fourmis, s'est penchée sur cette question (Rutter and Rausher 2004). Dans ce système, les fourmis assurent la protection de la plante contre les insectes herbivores en échange de bénéfices nutritifs (sucres des nectaires extra-floraux). Les auteurs ont comparé l'expression du trait mutualiste de la plante (la quantité de nectar extra-floral) entre trois traitements : (i) en l'absence de fourmis (bénéfices supprimés), (ii) en l'absence de tout insecte (bénéfices et coûts supprimés) et (iii) en présence de tous les insectes (témoin). Ils montrent (i) que la production de nectar est coûteuse, mais que le coût est indétectable en absence d'herbivores, (ii) que les bénéfices augmentent avec la quantité de nectar produite sans atteindre de plateau et (iii) qu'en présence des fourmis, les bénéfices surpassent les coûts. En revanche, ces coûts et bénéfices ne conduisent pas à la stabilisation de la quantité de nectar à une valeur d'équilibre intermédiaire : l'éventuel compromis n'est pas détecté. La gamme de variation explorée n'est peut-être pas assez large, elle pourrait être manipulée par sélection artificielle. Alternativement, la variabilité spatiale et temporelle des coûts et bénéfices serait telle qu'elle empêcherait la plante d'atteindre un optimum de quantité de nectar.

La difficulté de détecter des coûts et des compromis dans les symbioses mutualistes est peut-être celle de trouver des modèles expérimentaux appropriés. En ce sens, les nématodes entomopathogènes apparaissent comme un système biologique commode pour ce type d'étude.

Le chapitre précédent a montré que, pour un nématode, porter beaucoup de bactéries est à la fois bénéfique en phase parasitaire et coûteux en phase libre. La quantité de bactéries portées peut être considérée comme une mesure de l'investissement du nématode dans la symbiose. Nous avons vu que cet investissement n'est pas forcément payant, ceci dépend de nombreux facteurs, environnementaux notamment. Une question émerge maintenant : dans quelle mesure peut-on remplacer un symbiote qui ne se montre plus assez bénéfique, ou qui est trop coûteux ?

Quelques associations mutualistes montrent la possibilité des changements de partenaires, sans qu'il soit toujours aisé de les relier à une modification du bilan coûts-bénéfices de l'association. Par exemple, la succession de champignons ectomycorhiziens observée lors de la fermeture d'une prairie colonisée par une forêt serait plutôt due à une adaptation aux contraintes changeantes du milieu (niche libre au début, puis augmentation de la compétition entre champignons, puis adaptation au substrat particulier qu'est la litière) qu'aux variations des coûts et bénéfices de la symbiose (Shaw and Lankey 1994). En revanche, d'autres exemples de chan-

---

<sup>1</sup>Le compromis virulence-transmissibilité, notamment, sert de cas d'école pour les travaux théoriques et expérimentaux. Particulièrement bien explorés chez les microparasites de micro-organismes (de Paepe and Taddei 2006) commodes expérimentalement (cycle de vie court, faible encombrement...), ces compromis commencent aussi à l'être chez les macroparasites (Kover and Clay 1998).

gement de partenaire sont plus directement liés à ces coûts et bénéfices. Pour citer une association mutualiste non durable<sup>2</sup>, des pollinisateurs peuvent abandonner une espèce de plante s'ils trouvent une meilleure source de nectar ailleurs (Bronstein 1995). Terminons par deux exemples de symbioses mutualistes. Des expériences de translocation sur le cnidaire corallien *Montastraea annularis*, qui recrute ses xanthes dans le milieu environnant, ont montré qu'il modifie son cortège symbiotique en fonction de l'intensité lumineuse. Ainsi, les xanthes de type A et B, adaptées aux fortes intensités lumineuses, sont éliminées des individus transloqués à plus grande profondeur au profit de xanthes de type C, adaptées aux faibles intensités lumineuses (Rowan et al. 1997). Enfin, très récemment, Yates et al. (2008) ont montré que le trèfle (Fabacées) est capable de sélectionner une souche de *Rhizobium* fixant efficacement l'azote même si l'abondance des tricheurs dans le sol est cent fois plus importante !

Ces exemples montrent que l'hôte peut «choisir» son partenaire en fonction des bénéfices qu'il lui procure et des coûts qu'il lui impose. Est-ce aussi le cas chez les nématodes entomopathogènes ? Allons le vérifier expérimentalement, avec auparavant un petit détour sur le terrain pour tester la spécificité des associations nématode-bactéries dans la nature.

---

<sup>2</sup>Elle l'est à l'échelle évolutive, mais pas à l'échelle du cycle de vie des protagonistes compte tenu de la durée des visites.

## **Deuxième partie**

**De la fidélité dans les couples, ou comment  
aller voir ailleurs quand l'autre y va**

# Chapitre 1

## De la diversité et de la spécificité dans la nature

Plusieurs études de terrain sur la répartition des nématodes entomopathogènes ont montré que, partout dans le monde, une espèce de nématode est toujours retrouvée associée à la même espèce de bactérie (voir Boemare et al. (1997) pour revue). Aucune étude de ce type n'a, à ce jour, été menée en France métropolitaine. L'article qui suit est le fruit d'un échantillonnage de terrain à proximité de Montpellier. Il confirme la spécificité d'association déjà observée précédemment (Akhurst 1983) et le fait que la bactérie *Xenorhabdus bovienii* s'associe à plusieurs espèces de nématodes. Dans deux des sites testés, nous avons trouvé à la fois un *Steinernema* et un *Heterorhabditis*, ce qui ouvre la possibilité de compétitions entre ces deux nématodes sur le terrain.





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Invertebrate Pathology xxx (2008) xxx–xxx

---

 Journal of  
 INVERTEBRATE  
 PATHOLOGY
 

---

[www.elsevier.com/locate/yjipa](http://www.elsevier.com/locate/yjipa)

## Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France)

Vanya Emelianoff<sup>a</sup>, Nathalie Le Brun<sup>a</sup>, Sylvie Pagès<sup>b</sup>, S. Patricia Stock<sup>c</sup>, Patrick Tailliez<sup>b</sup>, Catherine Mouliat<sup>a</sup>, Mathieu Sicard<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Département Génétique et Environnement, équipe Interactions, Institut des Sciences de l'évolution UMR CNRS 5554, Université de Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34000 Montpellier, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Insectes et interactions hôte-Pathogène UMR INRA 1133, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34000 Montpellier, France

<sup>c</sup> Department of Entomology, University of Arizona, 1140 E. South Campus Drive, Tucson, AZ 85721, USA

<sup>d</sup> Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, UMR CNRS 6556, 40 avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France

Received 11 October 2007; accepted 25 January 2008

---

### Abstract

Isolation and identification of native nematode-bacterial associations in the field are necessary for successful control of endemic pests in a particular location. No study has yet been undertaken to recover and identify EPN in metropolitan France. In the present paper, we provide results of a survey of EPN and their symbiotic bacteria conducted in Hérault and Gard regions in Southern France. Molecular characterization of isolated nematodes depicted three different *Steinernema* species and one *Heterorhabditis* species, *H. bacteriophora*. *Steinernema* species recovered were identified as: *S. feltiae* and *S. affine* and an undescribed species. *Xenorhabdus* symbionts were identified as *X. bovienii* for both *S. feltiae* and *S. affine*. Phylogenetic analysis placed the new undescribed *Steinernema* sp. as closely related to *S. arenarium* but divergent enough to postulate that it belongs to a new species within the “glaseri-group”. The *Xenorhabdus* symbiont from this *Steinernema* sp. was identified as *X. kozodoii*. All *Heterorhabditis* isolates recovered were diagnosed as *H. bacteriophora* and their bacterial symbionts were identified as *Photorhabdus luminescens*. Molecular characterization of these nematodes enabled the distinction of two different *H. bacteriophora* strains. Bacterial symbiotic strains of these two *H. bacteriophora* strains were identified as *P. luminescens* ssp. *kayaii* and *P. luminescens* ssp. *laumondii*.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Entomopathogenic nematodes; *Steinernema*; *Heterorhabditis*; *Photorhabdus*; *Xenorhabdus*; Host-symbiont specificity; Molecular phylogeny; Symbiosis

### 1. Introduction

Nematodes in Steinernematidae and Heterorhabditidae are obligate insect pathogens that are symbiotically associated with Enterobacteriaceae bacteria from the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively. This symbiotic nematode-bacterial mutualism is highly specific, as

most of the nematode species cannot be re-associated with non-native bacterial species (Akhurst, 1983; Sicard et al., 2004). Entomopathogenic nematodes (EPN) are widely distributed throughout the world and have a wide range of insect hosts (Hominick, 2002). They are considered as one of the most relevant non-chemical alternatives to insect pest control due to their high reproductive potential, ease of mass production and their harmlessness to vertebrates and plants (Burnell and Stock, 2000; Gaugler, 2002). However, introduction of EPN as biocontrol agents in one particular site requires prior knowledge of their occurrence

\* Corresponding author. Fax: +33 (0)5 49 454015.

E-mail address: [mathieu.sicard@univ-poitiers.fr](mailto:mathieu.sicard@univ-poitiers.fr) (M. Sicard).

and proper identification of native species. Introduction of exotic EPN may (i) induce exclusion of the local populations and/or species, thus eroding natural diversity and (ii) be inefficient towards local insect pests as they may not be adapted to local environmental conditions (Miller and Barbercheck, 2001). Most surveys on EPN have mainly focused on the characterization and identification of the nematodes but not of their bacterial symbionts. However, several studies have shown that parasitic success of EPN relies on their specific bacterial partners (Poinar and Thomas, 1966; Sicard et al., 2003). Moreover, adaptation of a nematode strain to its environment is probably related to its association with its specific bacterial strain. Therefore, proper identification and characterization of nematodes' bacterial symbionts are also of crucial importance in an EPN-based biocontrol perspective. Many surveys have been conducted to address nematodes diversity in Europe (see Campos-Herrera et al., 2007 for review) but no study has been conducted so far in metropolitan regions of France. In the present study we provide results of an EPN and symbiotic bacteria survey conducted in Hérault and Gard, Southern France.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Regions sampled

Hérault and Gard regions have a Mediterranean climate (hot and dry summers with mild winters). Inland landscape is a patchwork of cultivated fields, meadows and small-shrubbed moors. The coast (South) is sandy with dune string and swamps. Northern parts of regions sampled exhibit calcareous relief with climactic oak forest on hills and meadows in valleys.

### 2.2. Sampling strategy

We sampled 25 locations in Hérault and Gard (Fig. 1). Of these 25 locations, 11 were non-agricultural areas (mostly sandy beaches and oak forests) and 14 were cultivated fields (vine or vegetable). To our knowledge, no EPN-based biocontrol treatment has ever been reported in any of the cultivated fields sampled. Locations consist in 100 m<sup>2</sup> areas in which each of the 50 sample points (see below) was 0.5 m distant from the nearest.

### 2.3. EPN isolation

EPN were recovered directly from the soil using a modified *Galleria*-trap technique consisting in placing a last instar larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Galleriidae) into a 0.5 ml Eppendorf tube pierced with 1 mm diameter holes as described by Kehres et al. (2001). At each location, 50 *Galleria*-traps were placed at three depths in the soil: 0, 10 and 20 cm, thus each site was tested with 150 *Galleria*-traps. The traps were left in the soil for 72 h before removal. Once in the laboratory, each tube was opened and dead insects were placed into White traps at 24 °C in the dark to collect emerging infective juveniles (IJs) (White, 1927). Insects that did not die during the soil baiting were kept in the laboratory for 1 week at room temperature. After their death, they were also placed in White traps. Infective juvenile nematodes were collected after emerging from the insects.

### 2.4. Identification of nematode species

According to the color of the infected *G. mellonella* cadavers, nematodes were sorted out as Steinernematids (cream, ocre color) or Heterorhabditids (red, burgundy

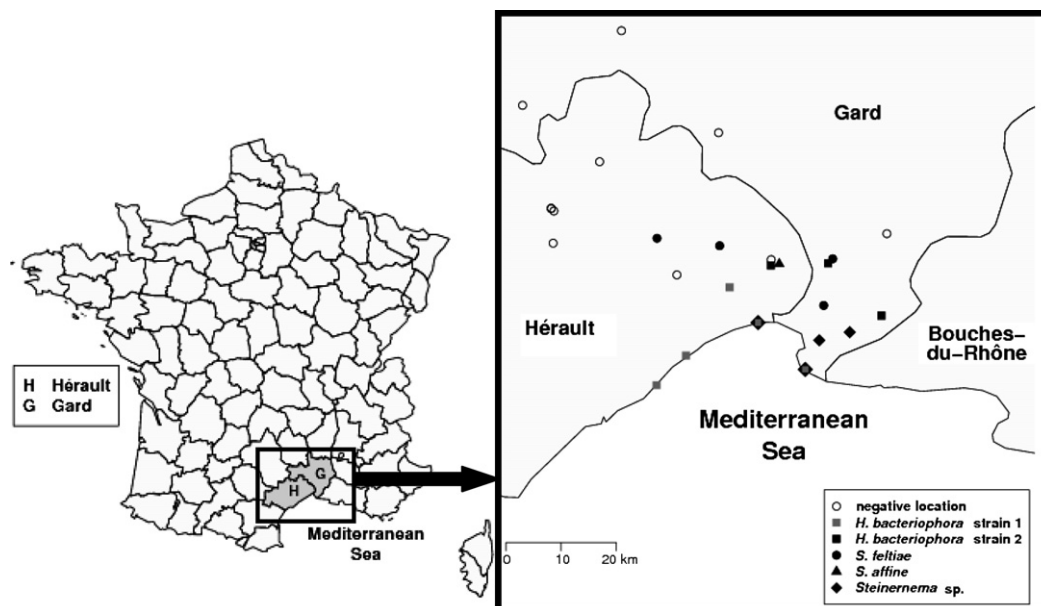


Fig. 1. Geographical distribution of sampled locations in Gard and Hérault and distribution of the different nematode species.

color). Molecular characterization of nematodes considered analysis of sequence data from the large subunit (LSU or 28S) of rDNA for *Steinernema* and the internal transcribed spacer region (ITS) of rDNA for *Heterorhabditis* (Hominick et al., 1997; Stock et al., 2001). We therefore sequenced and aligned partial sequence of 28S rDNA (695 nucleotides) for *Steinernema* nematodes and partial sequence of ITS rDNA (660 nucleotides) for *Heterorhabditis* nematodes. Molecular analysis was performed on adult females because their large size provided an appropriate amount of DNA. For this purpose, *G. mellonella* larvae were infected with IJs from each location to obtain adult females. Dead insects were dissected 3 days after infection and five nematode females were taken and put in alcohol 70°. Females were then crushed in an extraction buffer (Sicard et al., 2001) and the 28S or ITS region was amplified by PCR with primers described, respectively, in Hominick et al. (1997) and Stock et al. (2001). The amplified products were purified with the ExoSAP-IT kit (Amersham Biosciences). They were then sequenced with Big Dye Terminator reaction Mix (Applied Biosystems). Sequencing reactions were electrophoresed on an ABI 3130 XL automated sequencer (Applied Biosystems). Chromatograms were visually checked and sequences were aligned manually using BioEdit software (DNASTar Lasergene software,

Madison, WI, USA; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Multiple alignments of sequences obtained with either (i) GenBank 28S rDNA sequence from *Steinernema* species or (ii) GenBank ITS sequences from *Heterorhabditis* species gene sequences were obtained using CLUSTAL W included in the BioEdit software. We then performed a maximum parsimony phylogenetic analysis on these alignments using Phylo\_win software (Galtier et al., 1996). Bootstrap analysis was carried out with 1000 datasets. The phylogenetic analyses provided further support for species definition.

### 2.5. Extraction and identification of new bacterial isolates

For each location, bacteria were extracted from a pool of 500 freshly emerged IJs. To evaluate the bacterial amount contained in one IJs pool, the 500 IJs were immersed 10 min into a sterile Ringer solution with 10% w/vol sodium hypochloride to avoid any external contamination from the tegument. The IJs were then rinsed twice in sterile Ringer and crushed in 1 ml of sterile PBS buffer lacking Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> salts (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 l H<sub>2</sub>O sterile). One hundred microliters of the suspension was then streaked onto NBTA medium (Akhurst and Boemare, 1988). The Petri

Table 1  
Relationship between habitat type, proportion of locations where EPN were found and nematode-bacterial complexes characterization

Vegetation/crops	Proportion of location with EPN	Nematode species (GenBank Accession No.)	Bacterial symbiont species (GenBank Accession No.)	Locations
Beaches	4/4	<i>H. bacteriophora</i> strain 1 (EU180069)	<i>P. luminescens</i> ssp. <i>kayaii</i> (FR41) (EU190979)	Aresquiers, Maguelone, Espiguette, Grand Travers
		<i>Steinernema</i> sp. (EU177771)	<i>X. kozodoii</i> (FR48) (EU190977)	Espiguette, Grand Travers
Meadow	2/6	<i>H. bacteriophora</i> strain 1 (EU180069)	<i>P. luminescens</i> ssp. <i>kayaii</i> (FR41) (EU190979)	Melgueil
		<i>S. feltiae</i> (AF331906)	<i>X. bovienii</i> (FR44) (EU190978)	Saint Gély
		Negative locations	–	Blandas, Saint Martial, Montpellier, Puéchabon
Non-agricultural field	2/2	<i>H. bacteriophora</i> strain 2 (EU180070)	<i>P. luminescens</i> ssp. <i>laumondii</i> (FR42) (EU190980)	Lansargues 1 (Montagné)
		<i>S. affine</i> (AF331899)	<i>X. bovienii</i> (FR43) (EU190976)	Lansargues 2 (Chabaud)
Organic vine	7/8	<i>H. bacteriophora</i> strain 2 (EU180069)	<i>P. luminescens</i> ssp. <i>kayaii</i> (FR41) (EU190979)	Montcalm
		<i>H. bacteriophora</i> strain 2 (EU180070)	<i>P. luminescens</i> ssp. <i>laumondii</i> (FR48) (EU190980)	Aimargues 1 (Valescure)
		<i>Steinernema</i> sp. (EU177771)	<i>X. kozodoii</i> (FR48) (EU190977)	Aigues-Mortes 1 (Jarras), Aigues-Mortes 2 (Bosquet)
		<i>S. feltiae</i> (AF331906)	<i>X. bovienii</i> (FR44) (EU190978)	Aigues-Mortes 3 (Grand Corbière), Castries, Aimargues 2 (Petit Malherbe)
		Negative location		Beauvoisin
Other organic agricultural fields	0/3	–	–	Quissac, Lansargues 3 (Proust), Aniane
Oak forest	0/2	–	–	Frouzet, Puéchabon

The names and/or the accession numbers of nematode and bacterial reference strains registered in GenBank are between brackets.

dishes were incubated at 28 °C for 48 h. Colony Forming Units were then counted and some of them were taken for molecular analyses. The 16S rDNA gene sequences were obtained as previously described in Tailliez et al. (2006). Multiple alignments of the 16S rDNA gene sequences were obtained using CLUSTAL W included in the BioEdit software and the distance tree was calculated using the Kimura 2-parameter model and the neighbour joining method included in the PAUP software (Swofford, 2003). Bootstrap analysis was carried out with 1000 datasets. The phylogenetic analyses led to bacterial species assignment of the new isolates or to define the closest species previously described.

### 3. Results

#### 3.1. Isolation and identification of EPNs

EPNs were recovered from 15 locations onto 25 tested in all habitats sampled: beaches, meadow, non-agricultural field, organic vine except for oak forest and vegetable organic fields (Table 1). Overall, four different nematode species were found (Table 1). *Heterorhabditis* was encountered in eight localities (Fig. 1). ITS sequences led to assign all samples to the species *H. bacteriophora*. Nevertheless, we observed two different *H. bacteriophora* strains which

undoubtedly differed by four different sites on the ITS sequences (Fig. 2). Three different species of *Steinernema* were also recovered and identified as *S. feltiae*, *S. affine* and one undescribed *Steinernema* sp. which assigned to the “glaseri-group” on the basis of morphological criteria. Phylogenetic analyses showed that this new species is closely related to *S. arenarium* within the Clade V according to Nadler et al. (2006) (Fig. 3). This nematode strain exhibited 2.4% variability on 28S rDNA and 13.5% on ITS with *S. arenarium*. Co-occurrences between the undescribed *Steinernema* sp. and *H. bacteriophora* strain 1 were observed twice on beaches (Fig. 1).

#### 3.2. Extraction and identification of new bacterial isolates

The two *H. bacteriophora* strains encountered in this survey were associated with two different isolates of *Photorhabdus luminescens* subspecies. The first strain of *H. bacteriophora* was associated with *P. luminescens* ssp. *kayaii* in all locations whereas the second strain of *H. bacteriophora* was associated with *P. luminescens* ssp. *laumon-dii* in two locations and with *P. luminescens* ssp. *kayaii* in another one. For both strains of *H. bacteriophora* extraction of bacteria from pool of 500 IJs gave more than 1000 colony forming units (CFU). Each of the three *Steinernema* species sampled was associated with a distinct

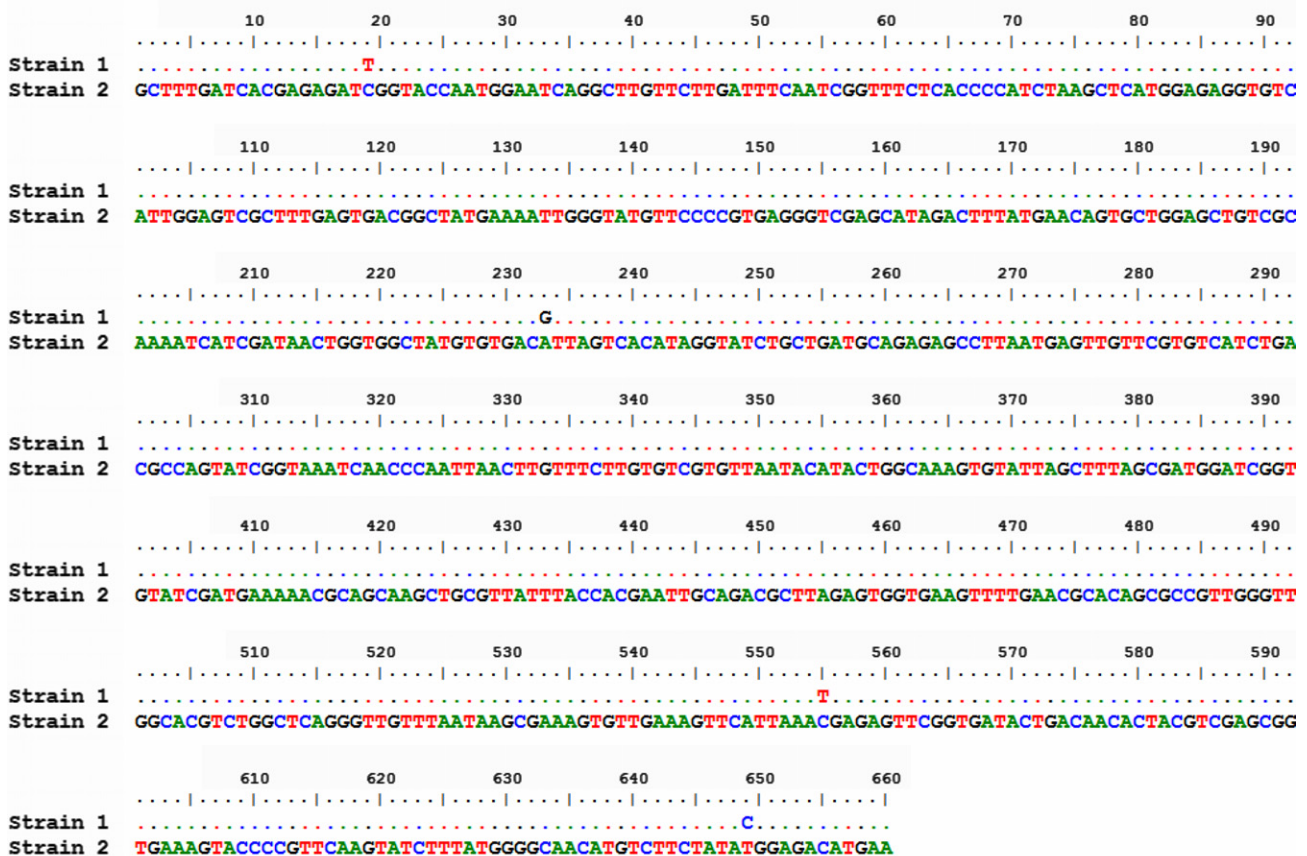


Fig. 2. Comparison of the ITS sequences from the two strains of *Heterorhabditis bacteriophora*.

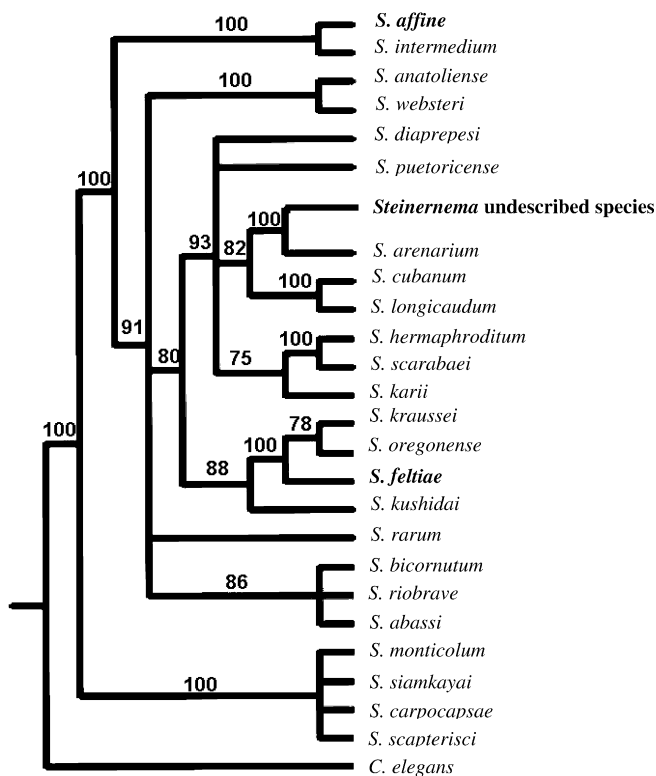


Fig. 3. Strict consensus of most parsimonious tree inferred by maximum parsimony analyses of each individual LSU data set. Bootstrap values (percentages of 1000 replicates) are shown at nodes. Nematodes found in our study are in bold font.

*Xenorhabdus* isolate. Thus, *S. feltiae* and *S. affine* were both associated with different *X. bovienii* isolates (see Fig. 4 and Table 1). For these two nematode species, extraction of bacteria from pool of 500 IJs gave between 20 and 50 CFU. The undescribed *Steinernema* sp. (found in four different locations in this survey) was found to be associated with an isolate of *X. kozodoii* close to the strain SaV<sup>T</sup> associated with *S. arenarium* (Fig. 4). For this nematode species, extraction of bacteria from pool a 500 IJs-pool gave less than 10 CFU.

#### 4. Discussion

To our knowledge, this study provides the first characterization of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria in metropolitan France (Hérault and Gard). In the prospected area, each nematode species was associated with a distinct bacterial isolate belonging to different *Xenorhabdus* or *Photorhabdus* species or subspecies. Our results strengthen the hypothesis of a strong specificity in the symbiotic interactions between EPN and bacteria. Thus, all over the world, each nematode species is always found to associate with the same bacteria species wherever the sampling is made. In our study, nematode-bacterium entomopathogenic complexes were found in very diverse habitats confirming again the wide plasticity to ecological

parameters of these organisms. Previous surveys have reported the presence of EPN in oak woodlands and forest (Stock et al., 1999; Sturhan and Liskova, 1999; Tarasco and Triggiani, 2005; Stock and Gress, 2006). However, in this study, no EPN was encountered in oak forests habitats. In Hérault and Gard, entomopathogenic complexes were found in organic cultured vines suggesting that such complexes could play a role in regulation of insect populations in these locations and that native biodiversity of EPN should be taken into account prior to any EPN-based bio-control program. Molecular characterization of EPNs led to the determination of one *Heterorhabditis* species and three different *Steinernema* species. Nematode diversity observed in this study is close to the diversity reported in previous studies in Northern Spain which constitutes the closest area already sampled and also the most similar in terms of climate and soil (Garcia del Pino and Palomo, 1996; Campos-Herrera et al., 2007). In Northern Spain, five different *Steinernema* species and *H. bacteriophora* were sampled. *S. feltiae* and *S. affine*, which are considered as the most common species in Europe, were found both in Southern France and in Northern Spain (Hominick, 2002). *H. bacteriophora* was also found in both regions confirming its abundance in Southern Europe (Hominick, 2002). All *Heterorhabditis* sampled belong to *H. bacteriophora* species. Nevertheless, ITS sequences variability led to the definition of two different strains within *H. bacteriophora* (Fig. 2). Both *H. bacteriophora* strains harbour many *Photorhabdus* cells (more than 1000 bacterial cells for 500 IJs). Molecular characterization of these symbionts showed that the strain 1 of *H. bacteriophora* was always associated to *P. luminescens* ssp. *kayaii* while the strain 2 of *H. bacteriophora* was associated to *P. luminescens* ssp. *laumondii* in two locations and to *P. luminescens* ssp. *kayaii* in another location (Table 1). Moreover, these two different strains of *H. bacteriophora* seem to have preferential habitats. Indeed *H. bacteriophora* strain 1 was mainly found on beaches, whereas *H. bacteriophora* strain 2 were never found in such habitats (Fig. 2). These preferential habitats suggest that the different *H. bacteriophora* strains would be adapted to distinct biotic (insect hosts, competitors, etc.) and abiotic (soil, salinity, etc.) factors. Molecular characterization of Steinernematidae bacterial partners showed that each *Steinernema* species was associated with a different *Xenorhabdus* isolate. As previously described, *S. feltiae* and *S. affine* are both associated with two different strains belonging to the species *X. bovienii* (Fig. 4) (Boemare, 2002; Tailliez et al., 2006). Bacterial phylogenetic analysis showed that the *X. bovienii* (FR44) isolated from *S. feltiae* is closer to *X. bovienii* (DSM4766<sup>T</sup>) previously isolated from *S. feltiae* in Australia than to *X. bovienii* (FR43) isolated from *S. affine* in the present study (Fig. 4). This result suggests specificity between nemato-bacterial partners with limited horizontal transfers of symbionts between *S. feltiae* and *S. affine* even if they harbour bacterial strains from the same bacterial species. The third *Steinernema* species found is phylogenetically related to *S. arenarium* but divergent

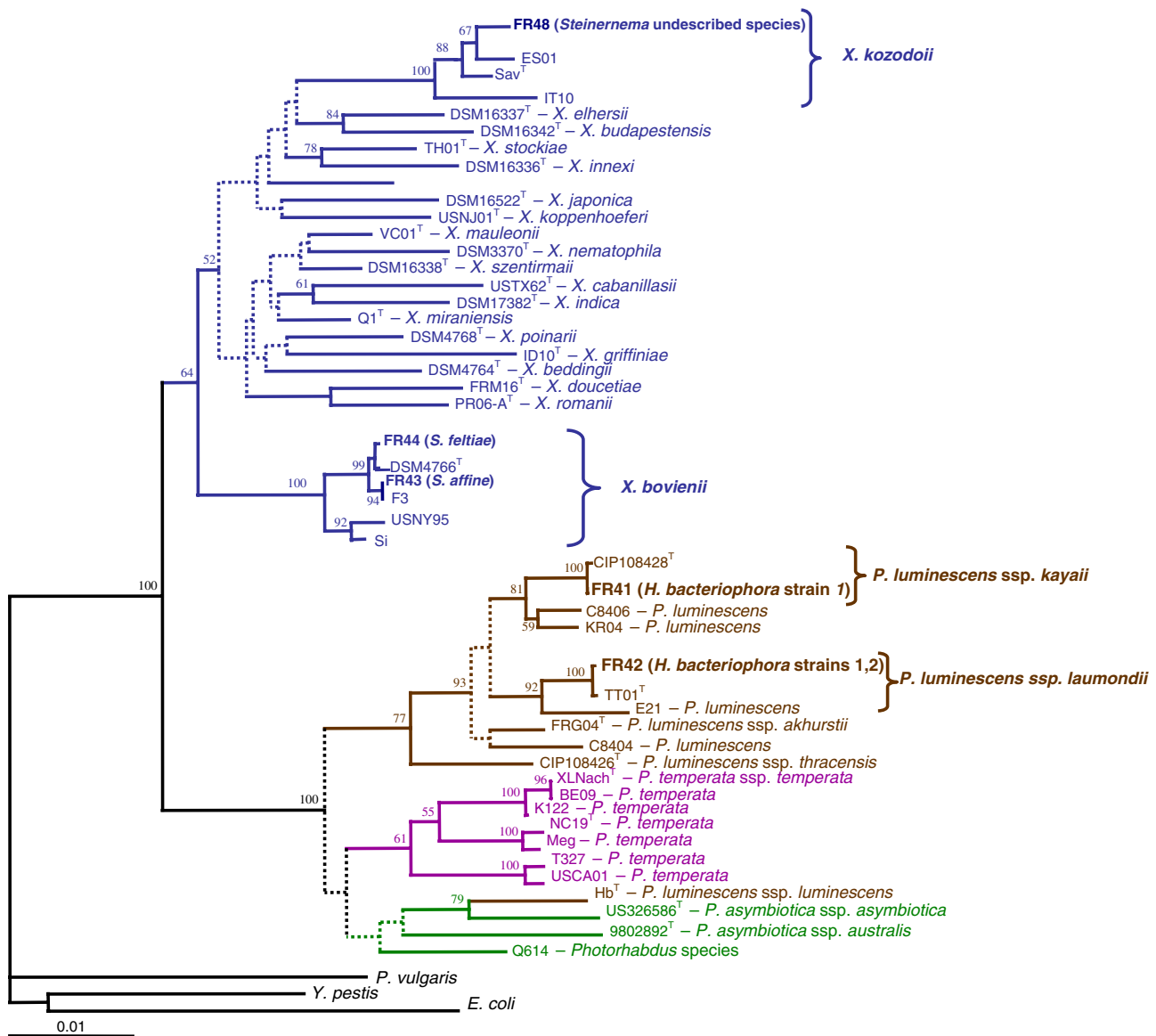


Fig. 4. Distance tree of bacterial symbionts (*Xenorhabdus* and *Photorhabdus*). The tree was constructed using the 16S rDNA gene sequences, the Kimura 2-parameter model and the neighbour-joining module of PAUP software (Swofford, 2003). Bootstrap values (percentages of 1000 replicates) are shown at nodes. Dashed lines indicate unreliable links between groups and unique sequences. Bar represents 1% sequence divergence. The phylogenetic positions of the different bacteria found in the different nematode species from the present study are indicated in bold.

enough to speculate that it belongs to a new species within the “glaseri-group”. The *Xenorhabdus* isolates obtained from this *Steinernema* sp. belongs to the species *X. kozodoii* (Tailliez et al., 2006) and is closely related to *SaV<sup>T</sup>* associated with *S. arenarium* and to the *ES01* associated with an undescribed nematode species from Northern Spain (Fig. 4). All along our survey, the number of bacteria isolated from infective juveniles is highly different between Heterorhabditidae and Steinernematidae. Indeed, Heterorhabditidae harboured more than 1000 *P. luminescens* cells per 500 IJs while all Steinernematidae harboured less than 50 *Xenorhabdus* bacterial cells per 500 IJs. The very small number of colonies obtained from *Steinernema* species after extraction from 500 IJs suggests that most of these IJs do not harbour any bacterial cell. Similarly, very small

bacterial loads were previously found in *S. scapterisci*, *S. riobrave* and *S. glaseri* (Akhurst, 1986; Aguilera et al., 1993; Bonifassi et al., 1999; Sicard et al., 2003). On the opposite, the most studied Steinernematidae: *S. carpocapsae* appears as an exception with more than 20,000 *X. nematophila* cells per 500 IJs (Vivas and Goodrich-Blair, 2001; Sicard et al., 2003). Bacterial number in IJs seems to be a major determinant of nematode fitness and life-history traits. Indeed, recent studies have compared several traits of *S. carpocapsae* (large bacteria number) and *S. scapterisci* (small bacteria number) (Sicard et al., 2005, 2006; Emelianoff et al., 2007). Authors showed that *S. scapterisci* was less dependent on its bacterial symbiont to reproduce in the insect than *S. carpocapsae*. Moreover, *S. scapterisci* was more able to reproduce with foreign *Xenor-*

*habdus* strains—even if it could not re-associate with them—than *S. carpocapsae*. Such an ability to reproduce with foreign *Xenorhabdus* strains could be an advantage in interspecific competition which seems to be not that rare in nature (Koppenhöfer et al., 1996; Miller and Barbercheck, 2001).

### Acknowledgments

Data used in this work were obtained in part through the molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 “Montpellier Environnement Biodiversité”. We thank P. Caminade, J. Claude, E. Desmarais, T. Noel, A. Orth, J.-M. Ourcival and G. Viudes for their technical support and O. Astruc, R. Barbier, D. Cauvin, L. Chabaud, J. Deryckere, J.-M. Ebel, J. B. Ferdy, B. Godelle, P. Guibal, P. Guiraud, P. Jeanjacques, P. Moine, F. Montagné, A. Pelissier-Tanon, F. Proust, G. Searle, S. Rambal, G. Viudes for kindly providing experimental fields.

### References

- Aguillera, M.M., Hodge, N.C., Stall, R.E., Smart, G.C., 1993. Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. J. Invertebr. Pathol. 62, 68–72.
- Akhurst, R.J., 1983. *Neoplectana* species: specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. Exp. Parasitol. 55, 258–263.
- Akhurst, R.J., 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Syst. Appl. Microbiol. 8, 142–147.
- Akhurst, R.J., Boemare, N.E., 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. J. Gen. Microbiol. 134, 1835–1845.
- Boemare, N., 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing UK, Wallingford, New York, USA, pp. 35–56.
- Bonifassi, E., Fischer-Le Saux, M., Boemare, N., Lanois, A., Laumond, C., Smart, G., 1999. Gnotobiological study of infective juveniles and symbionts of *Steinernema scapterisci*: a model to clarify the concept of the natural occurrence of monoxenic associations in entomopathogenic nematodes. J. Invertebr. Pathol. 74, 164–172.
- Burnell, A.M., Stock, S.P., 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. Nematology 2, 31–42.
- Campos-Herrera, R., Escuer, M., Labrador, S., Robertson, L., Barrios, L., Gutierrez, C., 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). J. Invertebr. Pathol. 95, 125–139.
- Emelianoff, V., Sicard, M., Le Brun, N., Moulia, C., Ferdy, J.B., 2007. Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. Parasitol. Res. 100, 657–659.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput. Appl. Biosci. 12, 543–548.
- Garcia del Pino, F., Palomo, A., 1996. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Spanish soils. J. Invertebr. Pathol. 68, 84–90.
- Gaugler, R., 2002. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing UK, Wallingford, New York, USA, 388 pp.
- Hominick, W.M., 2002. Biogeography. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing UK, Wallingford, New York, pp. 115–143.
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R., del Pino, F.G., Heng, J.A., Hunt, D.J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C., Yoshida, M., 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. J. Helminthol. 71, 271–298.
- Kehres, J., Denon, D., Mauleon, H., 2001. A simple technique to estimate, in situ, population densities of an entomopathogenic nematode (*Heterorhabditis indica*) in sandy soils. Nematology 3, 285–287.
- Koppenhöfer, A.M., Baur, M.E., Kaya, H.K., 1996. Competition between two Steinernematid nematode species for an insect host at different soil depths. J. Parasitol. 82, 34–40.
- Miller, L.C., Barbercheck, M.E., 2001. Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. Biol. Control. 22, 235–245.
- Nadler, S.A., Bolotin, E., Stock, S.P., 2006. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. Syst. Parasitol. 63, 161–181.
- Poinar, G., Thomas, G.M., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). Parasitology 56, 385–390.
- Sicard, M., Desmarais, E., Lambert, A., 2001. Molecular characterisation of Diplozoidae populations on five Cyprinidae species: consequences for host specificity. C. R. Acad. Sci. Sér. 3 324, 709–717.
- Sicard, M., Ramone, H., Le Brun, N., Pagès, S., Moulia, C., 2005. Specialization of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* with its mutualistic *Xenorhabdus* symbiont. Naturwissenschaften 92, 472–476.
- Sicard, M., Le Brun, N., Pages, S., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C., 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. Parasitol. Res. 91, 520–524.
- Sicard, M., Hinsinger, J., Le Brun, N., Pages, S., Boemare, N., Moulia, C., 2006. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes *Steinernema* is modified by their bacterial symbionts *Xenorhabdus*. BMC Evol. Biol. 6, 68.
- Sicard, M., Ferdy, J.B., Pagès, S., Le Brun, N., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C., 2004. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). J. Evol. Biol. 17, 985–993.
- Stock, S.P., Gress, J.C., 2006. Diversity and phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Sky Islands of Southern Arizona. J. Invertebr. Pathol. 92, 66–72.
- Stock, S.P., Pryor, B.M., Kaya, H.K., 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. Biodivers. Conserv. 8, 535–549.
- Stock, S.P., Campbell, J.F., Nadler, S.A., 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. J. Parasitol. 87, 877–889.
- Sturhan, D., Liskova, M., 1999. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in the Slovak Republic. Nematology 1, 273–277.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods), Version 4.0b10.
- Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N., Boemare, N., 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2805–2818.
- Tarasco, E., Triggiani, O., 2005. Entomopathogenic nematodes of forest habitats in Southern Italy and their pathogenicity for overwintering larvae of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. et Schiff.) (Lepidoptera, Thaumetopoeidae). In: Lieutier, L., Ghaïoule, D. (Eds.), Entomological Research in Mediterranean Forest Ecosystems. INRA ed., France, pp. 257–263.
- Vivas, E.I., Goodrich-Blair, H., 2001. *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host–bacterium interactions: *rpoS* is necessary for mutualism with nematodes. J. Bacteriol. 183, 4687–4693.
- White, G.F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66, 302–303.

## Chapitre 2

# De la robustesse des couples sur l'île de la tentation

Les types d'associations diffèrent entre espèces au sein du genre *Steinernema* :

- *S. carpocapsae* porte beaucoup de bactéries (environ 100 par IJ), ne retient que des souches de *Xenorhabdus nematophila*, bénéficie beaucoup de la symbiose et en paie le prix (Sicard et al. 2003 ; 2004b ; Emelianoff et al. 2007 ; 2008),
- *S. scapterisci* porte très peu de bactéries (en moyenne 0,07 par IJ), bénéficie peu de la symbiose et n'en paie pas le prix (Sicard et al. 2003 ; 2004b ; Emelianoff et al. 2007) ; les résultats sur les bactéries qu'il est capable de retenir sont contradictoires (Grewal et al. 1997 ; Sicard et al. 2005),
- *S. riobrave* porte peu de bactéries (environ une par IJ) et bénéficie «infiniment<sup>1</sup>» de la symbiose, obligatoire pour lui (Sicard et al. 2003),
- *in vitro*, *S. glaseri* semble moins spécifique que *S. carpocapsae* : il peut se reproduire avec, et retenir, d'autres bactéries que son symbiote naturel (Akhurst 1983 ; Dunphy et al. 1985).
- *in vitro*, *S. feltiae* ne retient que son symbiote mais peut se reproduire avec d'autres souches de *Xenorhabdus* (Akhurst 1983). Le deuxième point est confirmé par des données préliminaires *in vivo* (Sicard, non publié).

L'objectif de l'expérience qui suit est de relier les différences de traits d'histoire de vie des associations naturelles aux différences de spécificité. Nous avons exploré ceci chez deux espèces radicalement différentes : *S. carpocapsae* et *S. feltiae*. *X. nematophila*, le symbiote du premier nématode, n'est associé qu'à lui alors que *X. bovienii*, le symbiote de *S. feltiae*, est également associé à d'autres espèces de nématodes. Cette différence de spécificité du symbiote envers le nématode a-t-elle, réciproquement, son pendant en terme de spécificité du nématode envers le symbiote ? C'est ce que nous avons testé ici à l'échelle interspécifique, en réassociant expéri-

---

<sup>1</sup>Pour ce type d'interaction, on parlerait plutôt de dépendance acquise suivant de Mazancourt et al. (2005). Ces auteurs entendent par *dépendance acquise* la perte de performance d'une population en absence du partenaire due à son adaptation à la présence du partenaire. Ici la perte de performance concerne une fonction vitale d'un point de vue évolutif : la reproduction ; les nématodes seuls pouvaient se reproduire avant de devenir totalement dépendants de leurs bactéries pour assurer cette fonction.



mentalement chaque espèce de nématode avec d'autres espèces de *Xenorhabdus* que l'espèce native. Nous avons mesuré les traits d'histoire de vie habituels (reproduction, survie, nombre de bactéries portées) et les avons corrélés avec la distance phylogénétique séparant symbiote natif et symbiotes non-natifs comme dans Sicard et al. (2004b). D'autre part, la diversité des souches de *X. nematophila* et *X. bovienii* disponibles au laboratoire nous a permis d'aborder une question supplémentaire. En recombinaut chaque espèce de nématode avec différentes souches de bactéries de la même espèce que le symbiote naturel, on peut tester, en intra-spécifique, inter-souches, l'existence de la corrélation négative survie-reproduction détectée en intra-souche (voir chapitre 2 de la première partie). À cette différence près toutefois : les traits ne seront pas mesurés sur les mêmes générations. On pourra seulement conclure que les bactéries qui favorisent le plus la reproduction des nématodes sont aussi celles qui affectent le plus (ou le moins) leur survie, et non que les nématodes qui se reproduisent le mieux sont aussi ceux qui survivent le moins. Chaque point de la corrélation sera une souche de bactérie, un environnement bactérien dans lequel seront mesurés les traits du nématode, un peu à la manière d'une norme de réaction. L'expérience étant en cours, les parties Résultats et Discussion du manuscrit sont très incomplètes.

# Projet d'article : Specificity and its consequences in entomopathogenic nematode-bacteria symbioses

Elodie Chapuis<sup>†</sup>, Vanya Emelianoff<sup>†</sup>, Valérie Paulmier, Nathalie Le Brun, Sylvie Pagès, Mathieu Sicard and Jean-Baptiste Ferdy

Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier

c.c. 63 CNRS-UM2 UMR 5554

Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon

34095 Cedex 05 Montpellier, France

<sup>†</sup> These two authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Vanya Emelianoff

E-mail: [vanya.emelianoff@gmail.com](mailto:vanya.emelianoff@gmail.com)

Tel: +33-4-67144227

Fax: +33-4-67143622

## Abstract

In this work we investigate specificity in symbioses between *Steinernema* nematodes and *Xenorhabdus* bacteria. The life cycle of these symbioses comprises two phases: (i) a free stage in the soil, where Infective Juveniles (IJs) of the nematode carry bacteria in a digestive vesicle and search for insect hosts, and (ii) a parasitic stage into the insect where bacterial multiplication, nematode

reproduction and production of new IJs occur. Previous studies have shown that the association benefits to the nematode during the parasitic stage: parasitic success of nematodes significantly increases when they are associated to their bacteria. It has also been shown that benefits disappear and IJs do not retain bacteria when nematodes are experimentally re-associated with bacteria that are phylogenetically distant from the native symbiont. Thus, the association seems to be specific, at least in *Steinernema carpocapsae* and *S. scapterisci* on which the study has been conducted.

Here we analyzed the link between phylogenetic distance between native and foreign bacteria and (i) bacterial load in the vesicle, (ii) benefits of the symbiosis for two nematode species: *S. carpocapsae* and *S. feltiae*. To this aim we experimentally re-associated nematodes with different *Xenorhabdus* strains isolated (i) from the same *Steinernema* species and (ii) from other *Steinernema* with various phylogenetic relatedness. We found a negative correlation between bacterial load and phylogenetic distance between native and foreign bacteria on both nematode species, suggesting that bacterial retention by IJs is specific. In *S. carpocapsae*, parasitic success negatively correlates with phylogenetic distance between native symbionts and foreign ones, consistently with previous works. We did not detect any significant correlation between *S. feltiae*'s parasitic success and bacterial phylogenetic distance because of a huge parasitic success variability between bacterial strains within *Xenorhabdus bovienii* species. These results suggest that *S. carpocapsae*-*X. nematophila* and *S. feltiae*-*X. bovienii* symbioses work very differently concerning benefits specificity during insects' parasitism.

**Keywords:** mutualism, benefits, recognition, phylogeny, life-history traits, *Steinernema*, *Xenorhabdus*.

## Introduction

Organisms that are specialized on few resources have been described in various taxonomical groups such as bacteria, herbivorous (Yotoko et al. 2005) and predatory insects (Huffaker and Caltagirone 1986; Tauber and Tauber 1987), gastropods (Hay et al. 1989) or mammals (Mc Eachern et al. 2006). Still, the reason why these species do not exploit a wider range of resources remains unclear. Food specialization is indeed risky when resource abundance is unpredictable because of environmental stochasticity.

A central point in the theoretical literature on this issue is that the performance a species

achieves on a specific resource could trade-off against its performance on another resource. Such trade-offs have been demonstrated on organisms whose resources are organic molecules (e.g. bacteria) as well as on organisms whose resources are other organisms (see Rana et al. 2002, for predatory insects). Whether a species evolves toward being a specialist or conversely exploits a wide range of resources depends on the shape of this trade-off. If the trade-off is very steep, it is impossible for a species to exploit many resources with efficiency. In such a case, specialists can be favored by selection.

Specialization has also been described between partners of long-lasting interactions (see, for example, Gemmill et al. 2000 for parasitic symbioses and Summerer et al. 2008 for mutualistic ones). This specialization can be interpreted within the same theoretical framework as specialization on a resource. Specializing on a particular genotype of symbionts is indeed a way to capture an efficient partner (Douglas 1998). But additional features arise in the context of symbioses because the resource on which a species might specialize is itself evolving. Specificity can then be considered as a side-effect of a long common history and we could expect old associations to be more specific than recent ones (Sicard 2003 p. 78, Sicard et al. 2005). Additionally, in asymmetric symbioses, in which a host has to choose the symbionts it interacts with, the question of specialization often meets that of symbionts transmission. Specialization has been, for example, presented as a way to prevent symbionts mixing (Frank 1996). There are indeed empirical evidences that hosts derive more benefits from a single symbiont than from mixed infections because competition between symbiont genotypes could negatively affect host performances (Provasoli et al. 1968; Pearson et al. 1993; Oliver et al. 2006).

Specificity in symbioses is traditionally explored by depriving hosts from their symbionts, re-associating such aposymbiotic individuals with non-native partners and evaluating performances of the chimeric associations. This requires a biological model for which symbiosis is not obligate in experimental conditions, i.e. aposymbiotic individuals are easy to produce. In this study we chose to work on *Steinernema* entomopathogenic nematodes symbiotically associated with *Xenorhabdus* bacteria. These associations exhibit several characteristics which instate them as good experimental models: short life cycle, easy laboratory maintenance, facultative association for the nematodes which are thus available in aposymbiotic status, contrasting types of symbiotic interactions within *Steinernema* genus (Sicard et al. 2003). Their life cycle comprises two phases: a free stage in the soil, where Infective Juveniles (IJs) carry their bacterial symbionts into an intestinal vesicle (Bird and Akhurst 1983), and a parasitic stage in the

insect, where nematodes and bacteria multiply in parallel (see Figure 1 for details). Nematodes

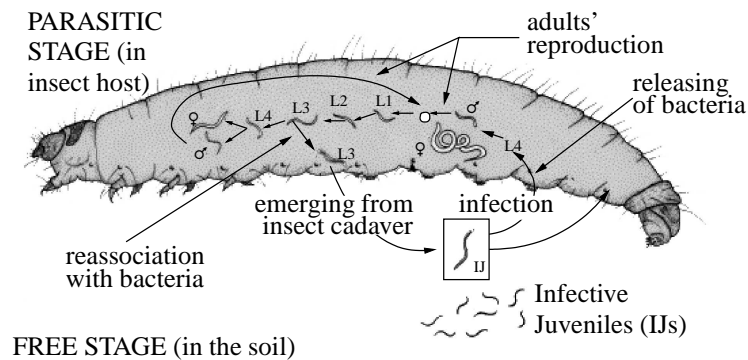


Figure 1: Life cycle of *Steinernema-Xenorhabdus* symbioses (drawing kindly provided by N. Le Brun). Infective Juveniles (IJs) are soil-dwelling third-stage larvae whose development has been arrested; they are non-feeding and carry their bacterial symbionts into a special intestinal vesicle (Bird and Akhurst 1983). After entering an insect host by natural openings, nematodes release their bacterial symbionts into the hemolymph. Both partners of the symbiosis secrete toxins against insect's immune system and bacteria multiply, provoking septicemia (Goodrich-Blair 2007); all these mechanisms contribute to insect death within 48 hours. Nematodes then feed on bacteria and metabolized insect tissues and reproduce into the insect for two or three generations. Newly formed IJs recruit a few bacterial cells in their vesicle, leave the insect cadaver and disperse in the soil.

benefit from the toxic activities of their bacteria towards insects and from the bioconversion of insect cadaver into easily assimilable nutrients (Forst and Neilson 1996). Reciprocally, bacteria benefit from protection by the IJs and transportation from host to host: indeed they are unable to survive in the soil (Morgan et al. 1997) and thus to encounter insects by themselves. Nematobacterial symbioses thus match the classic definition of mutualism. However recent works also showed costs to the association for nematodes (Mitani et al. 2004; Emelianoff et al. 2007). These costs and benefits correlate with the amount of symbionts nematodes carry, leading to a survival-reproduction trade-off in symbiotic nematodes (Emelianoff et al. 2008a).

Here we compared two species: *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*, which seem to have very different association modalities. Indeed, *S. carpocapsae* is associated with numerous bacteria cells and highly benefits from the symbiosis in terms of reproduction (Sicard et al. 2003). Moreover its bacterial partner, *Xenorhabdus nematophila*, was only found in *S. carpocapsae* nematodes and *S. carpocapsae* is only able to carry *Xenorhabdus nematophila*

(Sicard et al. 2004). On the contrary, *S. feltiae* is associated with few bacteria cells (Emelianoff et al. 2008b) and its *Xenorhabdus bovienii* bacterial symbiont is found in numerous other nematode species (Akhurst and Boemare 1988; Mráček et al. 2006). Benefits of the association for *S. feltiae* have been poorly investigated so far but preliminary data suggest much higher reproduction of symbiotic than aposymbiotic IJs (Sicard and Emelianoff, unpublished). Because of these differences in life-history traits and in the specificity of bacterial partners towards nematodes, we expect that these two nematode species will differ in symbiosis functioning and nematode specificity. More precisely, we would expect greater specificity of association in *S. carpocapsae* than in *S. feltiae*.

In fact, two levels of specificity are encountered in these associations. The first is a retention specificity: is the nematode able to carry other bacteria strains / species than the native one? If so, this would demonstrate common recognition mechanisms between bacterial strains. The second is a benefit specificity: does the nematode benefit from non-native bacteria as much as it does from the native one? If bacterial strains differ in the benefits they provide to nematodes, part of the variation in toxicity towards (and digestion of) the insect is probably genetic. Considering the results of Sicard et al. (2004; 2005) we would expect such differences, as well as greater retention and benefit specificities in *S. carpocapsae* than in *S. feltiae*.

To test these hypotheses, we re-associated aposymbiotic IJs from both species with their native symbiont, with other strains from the same species as the native symbiont as well as with other *Xenorhabdus* species. Benefits and bacterial load were measured on the chimeric associations. Benefit, in term of reproduction in parasitic stage, is the parasitic success of nematodes; bacterial load is the number of bacteria carried per IJ. We then tested the correlation between each of these traits and the phylogenetic distance separating native and non-native bacteria.

## **Materials and methods**

### **Biological material**

In this work we used two nematodes species:

- *Steinernema carpocapsae* strain *SK27* (Plougastel, Brittany, France), naturally associated with *Xenorhabdus nematophila* strain *F1*,

- *Steinernema feltiae* strain *VIN* (Aigues-Mortes, Gard, France), symbiotically associated with *Xenorhabdus bovienii* strain *FR45*.

*S. carpocapsae* has been kept in the laboratory for 25 years whereas *S. feltiae* was isolated from field in 2006 (Emelianoff et al. 2008b). Since their isolation, nematodes have been maintained by successive experimental infections of *Galleria mellonella* larvae, which provoke a genetic bottleneck for nematodes at each generation. Genetic polymorphism is thus probably much weaker in our *S. carpocapsae* pool than in our *S. feltiae* pool. For both species, aposymbiotic IJs were obtained by experimentally depriving symbiotic IJs of their bacteria as explained in Sicard et al. (2003).

Aposymbiotic and symbiotic IJs from both species can be kept alive during a couple of months at 8°C in the dark. They were maintained by successive infections of last instar *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Galleria mellonella* has been chosen as an experimental insect host because it is highly permissive to entomopathogenic nematodes which reduces the risk of confounding effects due to host resistance. Symbiotic bacteria of each nematode species were separately stored in 15% glycerol at -80°C.

## **Experimental design**

*Steinernema feltiae* was re-associated with 14 *X. bovienii* strains (including the native one) and 14 strains from other *Xenorhabdus* species. *S. carpocapsae* was re-associated with 15 *X. nematophila* strains (including the native one) and 18 strains from other *Xenorhabdus* species (Tables 1 and 2). We thus have 59 non-native re-associations.

In addition to those, we used aposymbiotic nematodes as negative controls to compare reproduction with foreign bacteria and reproduction without bacteria, and thus to test the eventual toxicity of bacteria towards nematodes reproduction. Moreover we used two positive controls, i.e. nematodes associated with their native symbiont. One of these positive controls consists in naturally symbiotic nematodes, the other consists in aposymbiotic IJs experimentally re-associated with their native bacteria. Comparing these two positive controls allows us to evaluate to which extent our re-association protocol reproduces ‘natural’ conditions. Comparing positive controls with chimeric associations will indicate if nematodes can carry as many foreign bacteria as natural ones and if they benefit from foreign bacteria as much as they do from their native symbiont.

For each treatment (nematode-bacteria combinations and controls) we infected 50 insects

Bacterial species and strain	Native nematode partner	Bacteria 16S rDNA Genbank accession no.	Geographical origin	Re-associated with <i>S. felitiae</i>	Re-associated with <i>S. carpocapsae</i>
<i>X. bovienii</i> FR45	<i>S. felitiae</i>	EU190978	France (A.-M.)	Yes	Yes
<i>X. bovienii</i> FR44	<i>S. felitiae</i>	EU190978	France (St Gély)	Yes	-
<i>X. bovienii</i> FR10	<i>S. felitiae</i>	AY521240	France (Brest)	Yes	-
<i>X. bovienii</i> USAR01	<i>S. oregonense</i>		USA (Arizona)	Yes	-
<i>X. bovienii</i> CA04	<i>S. kraussei</i>	DQ205454	Canada	Yes	-
<i>X. bovienii</i> CS66	<i>S. kraussei</i>	DQ205451	Czech Republic	Yes	-
<i>X. bovienii</i> USNY95	<i>S. kraussei</i>	DQ205453	USA (New York)	Yes	-
<i>X. bovienii</i> CS03	<i>S. weiseri</i>	DQ205452	Czech Republic	Yes	-
<i>X. bovienii</i> Si	<i>S. intermedium</i>	DQ205455	Australia	Yes	Yes
<i>X. bovienii</i> F3	<i>S. affine</i>	DQ202311	France	Yes	-
<i>X. bovienii</i> FR43	<i>S. affine</i>	EU190976	France (Lansargues)	Yes	-
<i>X. bovienii</i> TB20	<i>S. sichuanense</i>	DQ208305	China (Tibet)	Yes	Yes
<i>X. bovienii</i> SA02	<i>S. littorale</i>		Sardinia	Yes	-
<i>X. bovienii</i> T228 <sup>T</sup>	<i>S. felitiae</i>	AF455810	Australia	Yes	-
<i>X. nematophila</i> F1	<i>S. carpocapsae</i>	AY521241	France (Brittany)	-	Yes
<i>X. nematophila</i> ATCC19061 <sup>T</sup>	<i>S. carpocapsae</i>		France (Brittany)	Yes	Yes
<i>X. nematophila</i> PL31	<i>S. carpocapsae</i>	AY521242	Poland	-	Yes
<i>X. nematophila</i> BE06	<i>S. carpocapsae</i>	DQ211704	Belgium	-	Yes
<i>X. nematophila</i> ES96	<i>S. carpocapsae</i>	DQ211707	Spain	-	Yes
<i>X. nematophila</i> ES98	<i>S. carpocapsae</i>		Spain	-	Yes
<i>X. nematophila</i> A20	<i>S. carpocapsae</i>		Portugal	-	Yes
<i>X. nematophila</i> A24	<i>S. carpocapsae</i>		Russia	-	Yes
<i>X. nematophila</i> CBY	<i>S. carpocapsae</i>		China	-	Yes
<i>X. nematophila</i> AN6 <sup>F</sup>	<i>S. carpocapsae</i>	AY278674	USA	-	Yes
<i>X. nematophila</i> K97	<i>S. carpocapsae</i>		USA (California)	-	Yes
<i>X. nematophila</i> DD136	<i>S. carpocapsae</i>		USA	-	Yes
<i>X. nematophila</i> NC116	<i>S. carpocapsae</i>		USA (N Carolina)	-	Yes
<i>X. nematophila</i> K102	<i>S. carpocapsae</i>		Mexico	-	Yes
<i>X. nematophila</i> CA01	<i>S. carpocapsae</i>	DQ211705	Canada	-	Yes

Table 1: Bacterial strains of *Xenorhabdus bovienii* and *X. nematophila* re-associated with each species of *Steinernema*. A.-M., Aigues-Mortes. Undone re-associations are indicated by -.



Bacterial species and strain	Native nematode partner	Bacteria 16S rDNA Genbank accession no.	Geographical origin	Re-associated with <i>S. felitiae</i>	Re-associated with <i>S. carpocapsae</i>
<i>X. innexi</i> DSM16336 <sup>T</sup>	<i>S. scapterisci</i>	AJ810292	Uruguay	Yes	Yes
<i>X. stockiae</i> TH01 <sup>T</sup>	<i>S. siamkayai</i>	DQ202309	Thailand	Yes	Yes
<i>X. hominicki</i> KR01	<i>S. monticolum</i>	DQ205448	Korea	-	Yes
<i>X. hominicki</i> KE01 <sup>T</sup>	<i>S. kari</i>	DQ211719	Kenya	Yes	Yes
<i>X. indica</i> DSM17382 <sup>T</sup>	<i>S. thermophilum</i>	AM040494	India	-	Yes
<i>X. cabanillasii</i> USTX62 <sup>T</sup>	<i>S. riobrave</i>		USA	Yes	-
<i>X. budapestensis</i> DSM16342 <sup>T</sup>	<i>S. bicornutum</i>	AJ810293	Serbia	Yes	Yes
<i>X. szentirmaii</i> DSM16338 <sup>T</sup>	<i>S. rarum</i>	AJ810295	Argentina	Yes	Yes
<i>X. japonicus</i> DSM16522 <sup>T</sup>	<i>S. kushidai</i>	DQ202310	Japan	Yes	Yes
<i>X. griffithiae</i> ID10 <sup>T</sup>	<i>S. hermaphroditum</i>	DQ211710	Indonesia	Yes	Yes
<i>X. ehlersii</i> DSM16337 <sup>T</sup>	<i>S. longicaudum</i>	AJ810294	China	Yes	Yes
<i>X. poinarii</i> CU01	<i>S. cubanum</i>	DQ211706	Cuba	Yes	Yes
<i>X. poinarii</i> G6 <sup>T</sup>	<i>S. glaseri</i>	D78010	USA	-	Yes
<i>X. kozodoii</i> SaV	<i>S. arenarium</i>	DQ211716	Russia	Yes	Yes
<i>X. romanii</i> PR06 – A	<i>S. puertoricense</i>	DQ211717	Puerto Rico	Yes	Yes
<i>X. doucetiae</i> FRM16 <sup>T</sup>	<i>S. diaprepesi</i>	DQ211709	Martinique	Yes	Yes

Table 2: Bacterial strains of other *Xenorhabdus* species re-associated with each species of *Steinernema*. Undone re-associations are indicated by -.

and measured reproduction and bacterial load on nematodes emerging from these insects. Details on the methods used to re-associate nematodes with bacteria and to estimate life-history traits are given in the following sections.

## **Experimental infections and re-association with bacteria**

We used an infection device consisting in a 1.5-mL microtube whose bottom has been cut off, encased in another normal microtube. The upper microtube contains a cone of filter paper which goes through the hole into the lower microtube. To realize an infection, aposymbiotic IJs from a three-months-old pool were deposited on the paper in the upper microtube. We used 8 IJs for *S. carpocapsae* and 20 IJs for *S. feltiae* to take into account their different ability to infect, as done in Sicard et al. (2004). A *Galleria* larva was then introduced in each microtube and the nematodes and the insect were incubated together at 24°C for 24h. In order to experimentally re-associate aposymbiotic nematodes with bacteria, we injected 20  $\mu$ L of a bacterial suspension prepared following Sicard et al. (2004b) into the *Galleria* larvae we infected with nematodes 24h earlier. To take into account the different retentions of *S. carpocapsae* (around 120 bacteria per IJ, Emelianoff et al. 2008a) and *S. feltiae* (around two bacteria per IJ, Emelianoff et al. 2008b), we had to use different bacterial dilutions for insects infected with *S. carpocapsae* and with *S. feltiae*. We thus injected 1000 bacteria in each insect infected with 8 *S. carpocapsae* IJs and 40 bacteria in each insect infected with 20 *S. feltiae*. The number of bacteria injected was controlled *a posteriori* by streaking appropriate volumes of the injected dilution onto NBTA plates (31g Nutrient Agar, 2.5mg Bromothymol Blue, 1L sterile H<sub>2</sub>O) supplemented with 0.0025 ‰ (w/v) Triphenyl Tetrazolium Chloride and counting Colony Forming Units (CFU) after 48h-incubation at 28°C. These insects were then re-incubated at 24°C for 24-48h. We then added around 1 mL water in each lower microtube so that the filter paper steeped into it, allowing newly emerging IJs to escape from the insect cadaver and migrate to the water where they were easy to collect. Each 'tube trap' was observed several times after infection to check emergence of IJs. Newly emerged IJs were collected regularly to limit the time they spend at 24°C in the trap which could affect further measurements. All the nematodes collected from a single insect were regrouped in a 50 mL-centrifugation tube and kept at 8°C.

## **Life-history traits measurements**

### **Reproduction measurements**

For each treatment **parasitic success** is the proportion of successful infections, i.e. infections leading to emergence of ten IJs at least. It was measured after 10, 12, 14, 21 and 28 days at 24°C.

### **Retention measurement**

To test if IJs retain non-native bacteria and count them, newly emerged IJs were taken 13 days at most after they were collected. For three infections per treatment, we counted 100 IJs and placed them in a microtube. IJs were disinfected and rinsed following Sicard et al. (2003). We then crushed together the 100 IJs for five minutes with a microtube piston to liberate bacterial symbionts. Hundred microliters-samples of appropriate dilutions were streaked onto NBTA plates and incubated at 28°C for 48h. For each pool the number of bacteria per Infective Juvenile was estimated by counting CFU on each dish and using the mean of the 2-3 dishes counts.

## **Estimation of phylogenetic distances**

Bacterial 16S ribosomal DNA sequences were extracted from Genbank database when available or obtained by sequencing DNA extracted from living material. They were aligned using BioEdit software. Genetic distances were first calculated using a Kimura two-parameters model. A neighbor-joining tree was then calculated and pairwise distances between native and non-native partners were obtained from this tree. Hereafter we will use *bacteria distance* to refer to phylogenetic distance between native (*Xenorhabdus nematophila* strain F1 or *Xenorhabdus bovienii* strain FR45) and non-native (other strains) bacteria.

## **Statistical analysis**

Data were analyzed using R statistical software (R Development Core Team 2006). To test the relation between bacteria distance and bacterial load we used a non-parametric rank correlation test (Kendall). Parasitic success at each day were analyzed separately. For each date, the correlation between bacteria distance and parasitic success was tested using a generalized linear model with quasibinomial distribution to take over-dispersion into account.

# Results

## Retention - distance correlations

Using a non-parametric rank correlation test (Kendall), we found a significant negative effect of bacteria distance on retention for both nematode species ( $\tau = -0.4760$ ,  $p < 0.0001$  for *Steinernema carpocapsae* and  $\tau = -0.4930$ ,  $p < 0.0001$  for *S. feltiae*, see Figure 2).

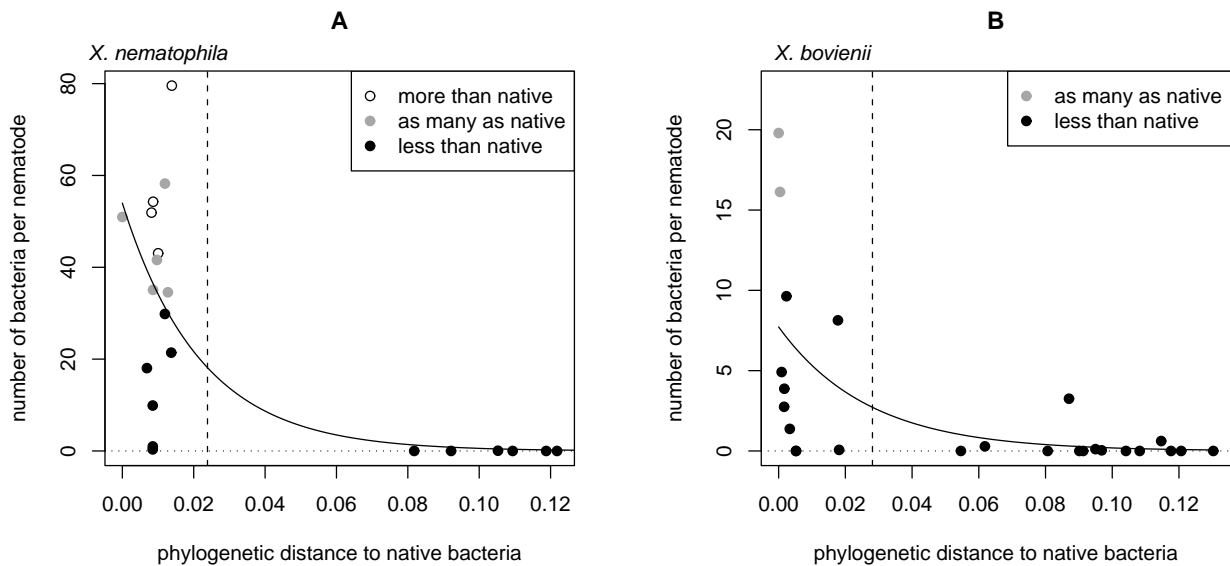


Figure 2: Number of bacteria carried per IJ as a function of phylogenetic distance between native and non-native bacteria for *Steinernema carpocapsae* (A) and *S. feltiae* (B). Each circle corresponds to the average of the three infections realized for a treatment. Different symbols describe the outcome of a comparison test between a treatment and the positive control (i.e. re-association with the native bacterial strain). Open circles, recombined strain is carried in significantly higher number than the native symbiont; closed black circles, recombined strain is carried in significantly lower number than the native symbiont; grey circles, no statistical difference. Regression curves correspond to a glm with Poisson error estimated on raw data for each nematode species.

## Reproduction - distance correlations

We used a generalized linear model with quasibinomial distribution where parasitic success is explained by phylogenetic distance between the native bacteria and non-native ones. We

also included the number of bacteria initially injected into the insect and its interaction with bacteria distance as explanatory variables in the model as they may be confounding cofactors. We found that *S. carpocapsae* associated with bacteria that are phylogenetically distant from the native symbiont succeeded less than those re-associated with bacteria more closely related to the native symbiont (Figure 3A). This was observed at day 12 and later (Fisher,  $F_{1,30} > 32.54$ ,  $p < 0.0001$ ), but not at day 10 (Fisher,  $F_{1,30} = 2.8993$ ,  $p = 0.0993$ ). For *Steinernema feltiae*, we did not detect any effect of phylogenetic distance between native and non-native bacteria on parasitic success whatever the day (Figure 3B).

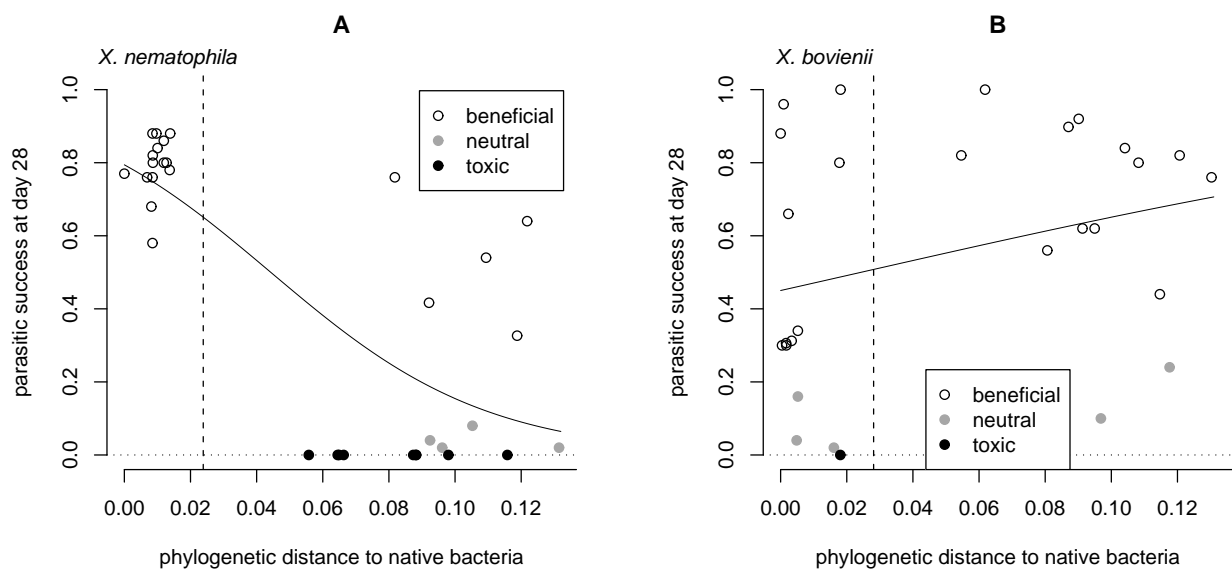


Figure 3: Proportion of successful infections after 28 days as a function of phylogenetic distance between native and non-native bacteria for *Steinernema carpocapsae* (A) and *S. feltiae* (B). Open circles, bacterial strains allowing a higher nematodes parasitic success than that realized by the aposymbiotic nematodes (thus beneficial for nematode reproduction); black circles, bacterial strains with which nematodes parasitic success is lower than aposymbiotic IJs' one (thus toxic for nematode reproduction); grey circles, bacterial strains allowing a parasitic success similar to that of aposymbiotic IJs (thus neutral towards nematode reproduction). For each nematode species, the regression curve corresponds to a glm assuming quasibinomial distribution.

## Discussion

In this work, we re-associated nematodes with non-native bacterial strains. This is somehow similar to reaction norm studies, where performances of a single genotype is measured in several environments, the environment being a bacterial environment in our case.

### Retention of bacteria by nematodes is specific

The number of bacteria carried negatively correlates with bacteria and nematode distances for *Steinernema carpocapsae* as well as for *S. feltiae*: both species exhibit retention specificity, retaining only bacteria that are closely related to their native symbiont. This could reflect co-evolution between partners in terms of recognition mechanisms between bacteria surface compounds and nematode's vesicle. This result is in agreement with a previous study that showed that *S. carpocapsae* nematodes only carry bacterial strains from *X. nematophila* species (Sicard et al. 2004). This retention specificity has also been shown in other symbioses such as the *Vibrio*-Sepiolid association (Nishiguchi et al. 1998). In this case, the competitive hierarchy among bacterial strains to colonize the sepiolid light organ mirrors the phylogenetic relatedness between squid-symbiont couples. In both nematode species the congruence between retention and bacteria phylogeny, however, is not perfect, some phylogenetically close bacteria being poorly retained -if not absent- in nematode vesicle. This suggests that 16s rDNA genes and partners recognition genes do not share the same history.

We also found that *S. carpocapsae* only retains *X. nematophila* and a unique other species (*X. griffiniae*, with very low bacteria number per IJ). Conversely, *S. feltiae* is able to retain many *Xenorhabdus* species other than its native one, with, again, low bacteria number per IJ. This tendency could reflect a looser recognition system in *S. feltiae* - *X. bovienii* than in *S. carpocapsae* - *X. nematophila*. But, on average, the correlations between retention and bacteria distance do not differ between the two nematode species. A more complete survey, including a study of the molecular mechanism of retention in *S. feltiae*, would be required to conclude on this point.

### Retention specificity is higher than reproduction specificity

*S. carpocapsae* parasitic success decreases with increasing phylogenetic distance of bacteria which is consistent with Sicard et al. (2004). This trophic specificity has also been supposed by

Han et al. (1991) and Gerritsen and Smits (1993).

Still, our results show that specificity tends to be more drastic on retention than on reproduction. Indeed, the range of bacteria strains increasing nematodes reproduction above that of aposymbiotics is broader than the range of bacteria they can retain into their vesicle. This is particularly clear with *Steinernema carpocapsae*: Figure 3A shows, for example, that *S. carpocapsae* benefits from phylogenetically distant bacteria it does not retain in its vesicle. This decoupling in the two types of specificity probably reflects radically different underlying molecular mechanisms of interaction. Indeed retention specificity relies on molecular recognition between nematode and bacteria. Several studies showed that bacterial genes coding surface molecules are necessary, if not sufficient, for *X. nematophila* to colonize *S. carpocapsae* IJs (Heungens et al. 2002; Cowles and Goodrich-Blair 2005; Chandra et al. 2008; Cowles and Goodrich-Blair 2008). On the contrary, reproduction specificity essentially relies on two activities of bacteria: (i) their pathogenicity towards the insect based on immuno-suppressive toxins secretion and (ii) their ability to digest and bioconvert insect cadaver into nutrients nematodes can assimilate. These activities probably depend on many different genes, and we can expect them to be less specific than a key-lock molecular interaction between bacteria's ligands and nematode's receptors. However a third bacterial activity can impair the benefits provided by bacterial insecticidal toxins and digestive enzymes: toxicity of bacteria towards nematodes. Such a toxicity is detected in our experiment as some bacterial strains reduce reproduction below that of aposymbiotic nematodes. In fact, part of the statistical signal that relates bacteria distance to parasitic success in *S. carpocapsae* is due to distant strains that significantly reduce parasitic success below that of aposymbiotic nematodes. The signal we detect could therefore reflect the specificity of anti-nematode toxins rather than that of genes that are directly involved in the exploitation of the insect host. This point needs further experimental testing.

### **The two nematode species exhibit different reproduction patterns with non-native bacteria**

As said before, we did find a significant negative correlation between bacteria distance and parasitic success in *S. carpocapsae*. Conversely, we did not detect such an effect in *S. feltiae*. Indeed, in *S. feltiae*, many distant bacterial strains are beneficial while, within *Xenorhabdus bovienii* species, some strains are toxic. We could therefore conclude that there is no specificity of parasitic success in *S. feltiae*, but this conclusion should be considered with caution. Indeed,

our sample contains *Xenorhabdus bovienii* isolates from two localities distant of only eleven kilometers. One of these strains is the native symbiont of *S. feltiae* we used in our experiment (FR45). With this strain, 44 infections out of 50 were successful at 28 days after infection. With the second strain, which is indistinguishable from the first based on its 16S rDNA, this number drops to 15. This clearly indicates that some local adaptation exists in *S. feltiae* at a very local geographical scale. This might therefore indicate that we did not detect specificity because we did not measure it at the right phylogenetic scale.

More generally, the extreme variability of *S. feltiae* parasitic success we observed within *X. bovienii* species could be partially due to recent isolation of this couple from the field and thus to greater variability than in *S. carpocapsae*-*X. nematophila* couple which was maintained in the laboratory for more than 20 years.

It could also be due to ecological differences between the two species, which in turn might exert different selective pressures on the two symbiotic associations. *S. carpocapsae* and *S. feltiae* differ, indeed, on many life history traits, their body size being one obvious difference. If selective pressures are stronger in one of the two species, namely in *X. bovienii*, they could produce more divergences in that species than in others. This accumulation of divergences could explain part of our results.

Another way to evolve rapidly is to receive genes from other organisms, and thus acquire new competences; such lateral gene transfers between bacteria has been widely described (Hentschel et al. 2000). In Rhizobia, plant-symbiotic bacteria, clusters of symbiosis-involved genes named “symbiotic islands” were found and exhibit characters of *pathogenicity islands* previously known in plant-pathogenic bacteria. In particular, the presence of integrase-coding genes indicates that this genomic islands are highly prone to lateral transfers (Finan 2002). These genomic islands were described in bacteria of the genus *Photorhabdus* as well, which are the sister group of *Xenorhabdus* and also involved in symbiosis with entomopathogenic nematodes (Waterfield et al. 2002). Thus the genetic background necessary for horizontal gene transfer may be present in *Xenorhabdus*. Moreover several horizontal transfers were described in *X. bovienii*, which is symbiotically associated with numerous nematode species (Sicard 2003; Mráček et al. 2006). These bacterial symbiont transfers between nematode species denote frequent multi-infections of a same insect with several nemato-bacterial couples, among which *S. feltiae* - *X. bovienii*: the environmental requirement for horizontal gene transfer may be filled as well. *X. bovienii* may thus be frequently in “new” nematodes, which could drive its fast evo-



lution. Direct perspectives of this work could consist, among others, in the characterization of symbiosis-involved genes within *X. bovienii* species and in an extensive co-phylogenetic study of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria to detect other bacteria associated with several nematode species, compare them with *X. bovienii* and evaluate the intra-specific, inter-strain variability.

## Aknowledgements

This work was supported by French Ministère de la Recherche (contribution n°ISEM 2008-XXX). We thank B. Godelle for helpful comments on this work.

## Literature cited

- R. J. Akhurst and N. Boemare. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *J. Gen. Microbiol.*, 134:1835–1845, 1988.
- A. F. Bird and R. Akhurst. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int. J. Parasitol.*, 13:599–606, 1983.
- H. Chandra, P. Khandelwal, A. Khattri, and N. Banerjee. Type 1 fimbriae of insecticidal bacterium *Xenorhabdus nematophila* is necessary for growth and colonization of its symbiotic host nematode *Steinernema carpocapsae*. *Env. Microbiol.*, 10(5):1285–1295, 2008.
- C. E. Cowles and H. Goodrich-Blair. The *Xenorhabdus nematophila* nilABC genes confer the ability of *Xenorhabdus* spp. to colonize *Steinernema carpocapsae* nematodes. *J. Bacteriol.*, 190(12):4121–4128, 2008.
- K. N. Cowles and H. Goodrich-Blair. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. *Cell Microbiol.*, 7(2): 209–219, 2005.
- A. E. Douglas. Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity*, 81: 599–603, 1998.

- V. Emelianoff, M. Sicard, N. Le Brun, C. Moulia, and J. B. Ferdy. Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. *Parasitol. Res.*, 100(3):657–659, 2007.
- V. Emelianoff, E. Chapuis, N. Le Brun, M. Chiral, C. Moulia, and J.-B. Ferdy. A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. *Evolution*, 62(4):932–942, 2008a.
- V. Emelianoff, N. Le Brun, S. Pagès, P. Stock, P. Tailliez, C. Moulia, and M. Sicard. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). *J. Invertebr. Pathol.*, in press(doi:10.1016/j.jip.2008.01.006), 2008b.
- T. M. Finan. Evolving insights: Symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.*, 184(11):2855–2856, 2002.
- S. Forst and K. Neilson. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.*, 60:21–43, 1996.
- S. A. Frank. Host-symbiont conflict over the mixing of symbiotic lineages. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 263:339–344, 1996.
- A. W. Gemmill, M. E. Viney, and A. F. Read. The evolutionary ecology of host-specificity: experimental studies with *Strongyloides ratti*. *Parasitology*, 120:429–437, 2000.
- J. Gerritsen and P. Smits. Variation in pathogenicity of recombinations of *Heterorhabditis* and *Xenorhabdus luminescens* strains. *Fundam. Appl. Nematol.*, 16:367–373, 1993.
- H. Goodrich-Blair. They’ve got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila*-*Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10(3):225–230, 2007.
- R. Han, W. Wouts, and L. Li. Development and virulence of *Heterorhabditis* spp. strains associated with *Xenorhabdus luminescens* isolates. *J. Invertebr. Pathol.*, 58:27–32, 1991.
- M. E. Hay, J. R. Pawlik, J. E. Duffy, and W. Fenical. Seaweed-herbivore-predator interactions: host-plant specialization reduces predation on small herbivores. *Oecol*, 81:418–427, 1989.
- U. Hentschel, M. Steinert, and J. Hacker. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 8(5):226–231, 2000.

- K. Heungens, C. E. Cowles, and H. Goodrich-Blair. Identification of *Xenorhabdus nematophila* genes required for mutualistic colonization of *Steinernema carpocapsae* nematodes. *Mol. Microbiol.*, 45(5):1337–1353, 2002.
- C. B. Huffaker and L. E. Caltagirone. The impact of biological control on the development of the Pacific. *Agric. Ecosystems Environ.*, 15:95–107, 1986.
- M. B. McEachern, C. A. Eagles-Smith, C. M. Efferson, and D. H. van Vuren. Evidence for local specialization in a generalist mammalian herbivore, *Neotoma fuscipes*. *Oikos*, 113: 440–448, 2006.
- D. K. Mitani, H. K. Kaya, and H. Goodrich-Blair. Comparative study of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, reared on mutant and wild-type *Xenorhabdus nematophila*. *Biol. Control*, 29:382–391, 2004.
- J. A. Morgan, V. Kuntzelmann, S. Taverno, M. A. Ousley, and C. Winstanley. Survival of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* in water and soil. *J. Appl. Microbiol.*, 83:665–670, 1997.
- Z. Mráček, K. B. Nguyen, P. Tailliez, N. Boemare, and S. Chen. *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a novel species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts, China. *J. Invertebr. Pathol.*, 93:157–169, 2006.
- M. K. Nishiguchi, E. G. Ruby, and M. J. McFall-Ngai. Competitive dominance among strains of luminous bacteria provides an unusual form of evidence for parallel evolution in Sepiolid squid-*Vibrio* symbioses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3209–3213, 1998.
- K. M. Oliver, N. A. Moran, and M. S. Hunter. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 273:1273–1280, 2006.
- J. N. Pearson, L. K. Abbott, and D. A. Jasper. Mediation of competition between two colonizing VA mycorrhizal fungi by the host plant. *New Phytol.*, 123:93–98, 1993.
- L. Provasoli, T. Yamasu, and I. Manson. Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convolvula roscoffensis* with different flagellate cultures. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 48:465–479, 1968.

- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006. URL <http://www.R-project.org>.
- J. S. Rana, A. F. G. Dixon, and V. Jarošík. Costs and benefits of prey specialization in a generalist insect predator. *J. Anim. Ecol.*, 71:15–22, 2002.
- M. Sicard. *Modalités écologiques et évolutives des interactions entre les nématodes entomopathogènes *Steinernema* et leurs symbiotes bactériens *Xenorhabdus**. PhD thesis, Université Montpellier 2, 2003.
- M. Sicard, N. Le Brun, S. Pagès, B. Godelle, N. Boemare, and C. Moulia. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitol. Res.*, 91:520–524, 2003.
- M. Sicard, J. B. Ferdy, S. Pagès, N. Le Brun, B. Godelle, N. Boemare, and C. Moulia. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J. Evol. Biol.*, 17:985–993, 2004.
- M. Sicard, H. Ramone, N. Le Brun, S. Pagès, and C. Moulia. Specialization of the entomopathogenic nematode *Steinernema* with its mutualistic *Xenorhabdus* symbionts. *Naturwissenschaften*, 92(10):472–476, 2005.
- M. Summerer, B. Sonntag, and R. Sommaruga. Ciliate-symbiont specificity of freshwater endosymbiotic *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.*, 44:77–84, 2008.
- C. A. Tauber and M. J. Tauber. Food specificity in predacious insects: a comparative ecophysiological and genetic study. *Evol. Ecol.*, 1:175–186, 1987.
- N. R. Waterfield, P. J. Daborn, and R. H. French-Constant. Genomic islands in *Photorhabdus*. *Trends Microbiol.*, 10(12):541–545, 2002.
- K. S. C. Yotoko, P. I. Prado, C. A. M. Russo, and V. N. Solferini. Testing the trend towards specialization in herbivore-host plant associations using a molecular phylogeny of *Tomoplagia* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 35:701–711, 2005.

# Discussion

Les complexes nématobactériens parasites d'insectes nous ont permis d'aborder expérimentalement deux problèmes majeurs de l'évolution des interactions durables : l'investissement dans la symbiose et la spécificité d'association. La première partie de la thèse présente une approche coûts-bénéfices aux échelles inter- (chapitre 1) et intra-spécifique, inter-familles (chapitre 2). Ces résultats peuvent être interprétés, de manière proximale, en terme de physiologie des associations nématode-bactéries. D'un point de vue plus global, ils renforcent l'idée d'un continuum parasitisme-mutualisme basé sur le bilan bénéfices-coûts pour chaque partenaire : pour le nématode, les bénéfices et les coûts de l'association varient de façon continue avec la quantité de symbiotes, ce qui aboutit à un compromis entre survie et reproduction. Ce compromis est l'expression de conflits d'intérêts dont on pourrait attendre qu'ils déstabilisent l'association. Nous verrons quelles forces sont susceptibles de stabiliser la symbiose et comment elles peuvent, éventuellement, aboutir à augmenter la spécificité. Nous discuterons enfin des conséquences évolutives de l'existence du compromis, ce qui ouvrira des perspectives pour poursuivre ce travail.

## **1. Supputations physiologiques**

### **1.1. Mécanisme du bénéfice**

Le chapitre 2 de la première partie montre que le nématode bénéficie de l'association en phase parasitaire. Plus précisément, le nombre de symbiotes introduit dans l'insecte augmente la réussite parasitaire des nématodes (leur probabilité de se reproduire). De la même façon, on a pu montrer que la réussite parasitaire des infections à vingt IJs est supérieure à celle des infections à huit IJs chez les nématodes symbiotiques mais pas chez les nématodes aposymbiotiques (Figure 5, gauche). Un tel effet dose est donc, probablement, un effet de la dose de bactéries plutôt que de nématodes. À l'inverse, le succès reproductif des nématodes (le nombre de descendants sachant qu'ils se sont reproduits) ne dépend pas du nombre de bactéries qu'ils introduisent dans l'insecte. Ainsi, ce nombre semble être crucial lors des toutes premières étapes du cycle parasitaire, et moins important ensuite.

Après leur entrée dans l'insecte, les nématodes s'y installent sans être reconnus par le système immunitaire, libèrent leurs bactéries symbiotiques, submergent les défenses de l'insecte et commencent à se reproduire. Ces étapes précoces de la phase parasitaire sont, d'après nos résultats, facilitées quand les bactéries sont initialement assez nombreuses dans l'insecte. Pour la première étape critique, celle de la lutte avec le système immunitaire de l'insecte, les principaux acteurs sont les toxines des deux partenaires (voir encadré 1, p. 10-11). Pour la seconde étape, celle de la reproduction du nématode, les bactéries métabolisent les tissus de l'insecte en nutriments facilement assimilables par les nématodes : ces derniers se nourrissent du cadavre décomposé par leurs symbiotes, ainsi que des bactéries elles-mêmes (Poinar and Thomas 1966). Le nombre de bactéries initialement introduit dans l'insecte serait donc un facteur limitant, surtout pour la première de ces deux étapes. En revanche, il n'est pas déterminant une fois que les nématodes se sont reproduits : à ce moment-là du cycle, le cadavre de l'insecte est vraisem-

blement un bouillon de culture et l'effet du nombre de bactéries initialement introduit est complètement estompé par les générations de multiplication bactérienne.

Ces idées sont en accord avec les données de Sicard et al. (2004a) sur la cinétique de croissance bactérienne dans l'insecte. En effet, après injection des bactéries, il y a clairance partielle par le système immunitaire de l'insecte. Cette réduction drastique de la population de symbiotes est suivie d'une reprise de croissance, qui aboutit finalement à la septicémie (Figure 5, droite, courbe en gras). On peut imaginer que le système immunitaire de l'insecte est submergé au-delà d'une certaine concentration-seuil de bactéries. Si l'on introduit moins de bactéries dans l'insecte initialement, on peut penser que la clairance fera chuter la population bactérienne à un effectif très bas, ralentissant donc la reprise de croissance (Figure 5, droite, courbe fine). Le nématode sera donc plus longtemps en contact avec le système immunitaire de l'hôte ( $\Delta t_2 > \Delta t_1$ ), ce qui peut affecter sa probabilité d'installation et/ou de reproduction (réussite parasitaire). Plus probablement, des effets stochastiques pourraient affecter la population bactérienne lorsqu'elle est à son niveau le plus bas et conduire à son extinction totale après clairance, ce qui entraverait le déroulement du cycle parasitaire du nématode.

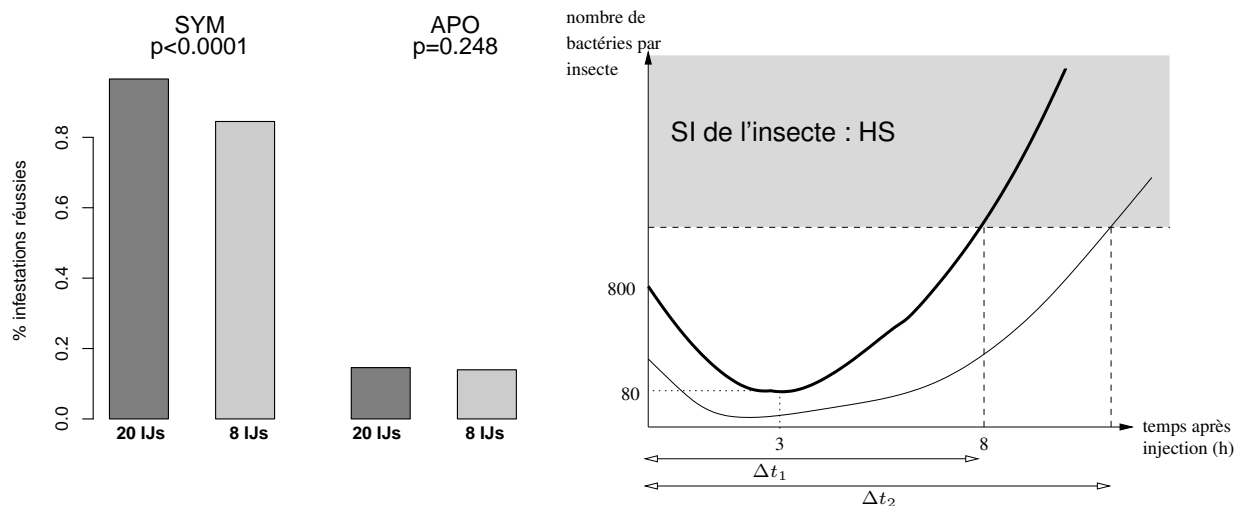


FIG. 5. Graphe de gauche : Réussite parasitaire des IJs symbiotiques (SYM) et aposymbiotiques (APO) en infectant les insectes avec 20 ou 8 nématodes, 28 jours après infection. Graphe de droite : cinétiques bactériennes dans l'insecte. La courbe en gras est reproduite d'après les données de Sicard et al. (2004a) après injection directe de 800 bactéries dans une chenille de *Spodoptera littoralis*. La courbe fine est entièrement hypothétique ; si moins de bactéries sont initialement injectées dans l'insecte, on attend un effectif minimum plus bas et un délai plus important avant la reprise de croissance. SI : Système Immunitaire ; HS : Hors Service. La charge bactérienne limite au-delà de laquelle le système immunitaire de l'insecte est hors d'état de nuire au couple nématode-bactérien est purement spéculative.

## 1.2. Mécanisme du coût

Nous avons montré, au chapitre 2 de la première partie, que l'association avec des bactéries est coûteuse pour les nématodes en phase libre. Deux hypothèses principales sont plausibles

pour expliquer l'augmentation de mortalité des nématodes avec le nombre de bactéries portées.

Le coût à porter des bactéries pour le nématode pourrait être dû à la toxicité intrinsèque des bactéries. Les symbiotes, en effet, ont une large gamme d'activités insecticides, bactéricides et également nématocides (cf encadré 1, p. 10-11). L'expression de la plupart de ces toxines est induite au contact de l'hémolymph des insectes ; toutefois, un niveau d'expression même faible pourrait affecter la survie des nématodes, d'autant plus que les bactéries, loin d'être quiescentes, se multiplient dans la vésicule (Martens et al. 2003 ; Sicard 2003 ; Sicard et al. 2004a). Un coût indirect de la toxicité bactérienne pour les nématodes pourrait également être envisagé : si on imagine que le nématode enclenche une réponse immunitaire contre ses symbiotes, la surmortalité du nématode pourrait être l'expression du coût de la défense. Toutefois, aucun argument expérimental ne vient appuyer ces hypothèses à ma connaissance.

Un autre mécanisme possible impliquerait une compétition pour les ressources entre bactéries et nématodes. En effet, les stades infestants du nématode ne s'alimentent pas (Poinar and Leutenegger 1968), leur quantité de réserves est donc limitée. Or la multiplication des bactéries symbiotiques dans la vésicule intestinale du nématode nécessite des nutriments. Ces ressources sont forcément puisées sur les réserves énergétiques du nématode, et d'autant plus que la charge symbiotique du nématode est grande. Les ressources allouées aux symbiotes ne le sont pas à la survie du nématode : plus il a de bactéries à entretenir, moins il lui reste de réserves pour lui-même, plus brève sera sa vie.

### 1.3. Conflit d'intérêts : qui contrôle la rétention ?

Nous avons vu au chapitre 2 de la première partie que le compromis survie-reproduction chez le nématode peut se décomposer en deux corrélations : une augmentation de la reproduction avec la rétention, et une augmentation de la mortalité avec la rétention. Ce compromis est l'expression d'un conflit d'intérêts entre partenaires, conflit dans lequel la rétention semble un trait crucial puisqu'elle détermine en partie les autres traits d'histoire de vie du nématode. La variabilité observée dans notre expérience, où la diversité génétique est probablement faible, montre que ce trait est, en partie au moins, plastique. En supposant qu'il existe aussi de la variation génétique sur ce trait, les conséquences évolutives du conflit d'intérêts dépendent de qui contrôle la rétention. Malgré la multiplication bactérienne dans la vésicule (Martens et al. 2003 ; Sicard et al. 2004a), la charge symbiotique d'un stade infestant de nématode reste stable (voire diminue, Flores-Lara et al. 2007) au cours du temps. La multiplication est donc compensée par une mortalité bactérienne, pour laquelle Herbert and Goodrich-Blair (2007) proposent trois origines, une bactérienne et deux venant du nématode :

- l'accumulation de produits toxiques dans la vésicule, liée à la présence des bactéries, et qui agirait un peu comme un système de *quorum-sensing*<sup>2</sup>,

---

<sup>2</sup>Un signal diffusible de *quorum-sensing* est connu chez *X. nematophila*. Il est produit pendant la phase parasite et intervient dans la pathogénicité envers l'insecte : il restaure, par injection dans l'insecte, le phénotype pathogène de souches bactériennes avirulentes (augmentation de la sécrétion d'enzymes, diminution de l'activité phénoloxydase de l'insecte) (Dunphy et al. 1997).



- la limitation, quantitative et/ou qualitative, des ressources dans la vésicule. Deux arguments en faveur de ceci : la croissance de *X. nematophila* est plus rapide dans l'hémolymphe d'insecte que dans la vésicule du nématode (une multiplication toutes les 2h26 et une toutes les 10h, respectivement ; Herbert and Goodrich-Blair 2007) ; certains mutants métaboliques de *Xenorhabdus nematophila* sont incapables de coloniser la vésicule du nématode, indiquant que certains composés (méthionine, thréonine, vitamine B<sub>6</sub>) en sont absents (Martens and Goodrich-Blair 2005 ; Flores-Lara et al. 2007),
- un contrôle direct par le nématode qui tuerait sélectivement une partie de ses symbiotes lorsqu'ils se feraient trop envahissants. Un tel contrôle du nombre de symbiotes par l'hôte a déjà été observé chez le calmar *Euprymna scolopes* associé symbiotiquement à la bactérie *Vibrio fischeri* (Visick and Ruby 2006), chez le charançon *Sitophilus oryzae* et ses endosymbiotes (Nardon et al. 1998) ou lors du blanchissement des coraux en cas de stress<sup>3</sup>. Ce type de régulation permettrait au nématode d'éliminer des bactéries non mutualistes et de contrôler la croissance de son symbiote (Mc Fall-Ngai 1998). On retrouve là le scénario de riposte de l'hôte contre les symbiotes trop coûteux déjà mentionné en introduction, et que nous développerons plus amplement par la suite.

La charge symbiotique maximale, elle, pourrait résulter d'une contrainte micro-anatomique. En effet, *X. nematophila* occupe des sites bien précis dans la vésicule, rassemblés autour de structures appelées IVS (Intra Vesicular Structures<sup>4</sup>). Les lipoprotéines *NilA*, *B* et *C*, présentes dans la membrane externe des bactéries, pourraient interagir avec ces structures ou avec le mucus qui les entoure (Cowles and Goodrich-Blair 2004 ; Goodrich-Blair and Clarke 2007) (voir encadré 2, p. 79-80). Si le nombre de récepteurs, i.e. de sites de fixation pour les bactéries, est limitant, la rétention sera mécaniquement bornée. La variabilité naturelle de rétention que nous avons observée chez *S. carpocapsae* pourrait être due à une variabilité, génétique ou plastique, d'expression des récepteurs à symbiote.

---

<sup>3</sup>Le blanchissement est dû à l'expulsion des xanthes. A l'opposé, le nombre de symbiotes par cellule augmente avec la profondeur : c'est le mécanisme de la photoadaptation.

<sup>4</sup>Agrégats de petites sphères anucléées contenues dans la vésicule et baignées par une sorte de mucus qui réagit à une lectine de blé (Martens and Goodrich-Blair 2005). Cette lectine reconnaît spécifiquement des motifs osaminiques (N-acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique) qui pourraient également être reconnus par des adhésines bactériennes (candidates : pili, *NilB*, *NilC*). Chez le calmar *Euprymna scolopes*, le mucus est le site de liaison spécifique pour les bactéries symbiotiques (*Vibrio*), et sa sécrétion par le calmar est considérée comme l'étape première assurant la spécificité de l'interaction (Nyholm and Mc Fall-Ngai 2003).

## Encadré 2. Dans l'intimité de la symbiose : les gènes de reconnaissance.

Le principal modèle d'étude de ces gènes est *Xenorhabdus nematophila*, associée spécifiquement à *Steinernema carpocapsae*. Les bactéries associées aux nématodes portent toujours des pili<sup>a</sup>, ce qui suggère un rôle de ces structures dans la colonisation de la vésicule du nématode (Binnington and Brooks 1993). Ce rôle a été confirmé tout récemment par une équipe indienne (Chandra et al. 2008). Ces pili sont également impliqués dans l'interaction des bactéries avec le système immunitaire de l'insecte : agrégation des hémocytes (Moureaux et al. 1995), cytotoxicité par formation de pores membranaires (Khandelwal et al. 2004 ; Banerjee et al. 2006).

Historiquement, la première étude moléculaire sur les gènes bactériens impliqués dans la symbiose a montré que le gène *rpoS*, qui code le facteur de transcription  $\sigma^S$ , est nécessaire à la rétention de la bactérie dans le tube digestif des nématodes (Vivas and Goodrich-Blair 2001). Chez de nombreuses bactéries *Gram*<sup>-</sup>, ce facteur de transcription contrôle des régulateurs intervenant dans la résistance aux stress, la survie ou les interactions avec un hôte comme chez *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia entomophila* ou *Salmonella enterica*. Les mutants *rpoS*<sup>-</sup> ne colonisent pas le tube digestif des nématodes. Ils sont plus sensibles aux stress et plus mobiles, peut-être du fait d'une expression anormale des flagelles qui inhiberait la colonisation du nématode<sup>b</sup>. En revanche ils sont aussi pathogènes envers l'insecte que les bactéries sauvages.

Un an plus tard, la même équipe a criblé une banque de gènes bactériens pour détecter des mutants de colonisation des nématodes (Heungens et al. 2002). Outre *rpoS*, semblent impliqués :

- d'autres gènes régulateurs :
  - *rpoE*, qui code le facteur  $\sigma^E$ , activé en cas de stress extracytoplasmique. Ce facteur induit l'expression de protéines de stress et est impliqué, chez d'autres organismes, dans la protection contre les stress oxydatifs et l'interaction avec l'hôte (Humphreys et al. 1999 ; Mathee et al. 1999). Il pourrait favoriser la survie de *X. nematophila* dans la vésicule, milieu éventuellement peu propice pour les bactéries, surtout si le nématode impose un stress nutritif ou toxique,
  - *lrp*, pour leucine-responsive regulatory protein, la leucine étant considérée comme un senseur général de l'état nutritionnel des bactéries. Chez *E. coli*, le produit de ce gène est impliqué dans la régulation de la synthèse des acides aminés, le catabolisme, la motilité, l'organisation chromosomique et l'osmolarité.

<sup>a</sup>Structures filiformes de 2 à 7 nm de diamètre et de quelques micromètres de long, présentes à la surface des bactéries. Constitués par la polymérisation d'une brique de base, la piline, ils se terminent par une adhésine. Non impliqués dans la motilité contrairement aux flagelles, les pili le sont en revanche dans les phénomènes d'adhérence (chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* par exemple) et de conjugaison. Ils ont également des propriétés antigéniques.

<sup>b</sup>La modification du patron d'expression des flagelles empêche la colonisation de la trachée de Rat par la bactérie *Bordetella bronchiseptica* (Akerley et al. 1995).

- deux gènes similaires à des gènes codant des enzymes de biosynthèses d'acides aminés, dont un est impliqué dans la pathogenèse chez de nombreuses bactéries dont *Salmonella typhimurium* (Hoiseth and Stocker 1981),
- *nilA*, *B*, *C* et *D* (pour nematode intestine localization). L'originalité de ces gènes est qu'ils sont complètement nouveaux et, dans l'état actuel des connaissances, présents uniquement chez *Xenorhabdus nematophila*, ce qui suggère des fonctions très spécifiques.
  - *NilA* contiendrait un peptide signal non clivable et deux domaines trans-membranaires.
  - *NilB* contient un peptide signal clivable. Le gène *nilB* est similaire à un gène codant une protéine putative de la membrane externe de *Neisseria meningitidis*<sup>a</sup>, qui pourrait intervenir dans l'import de fer, important pour la survie bactérienne (Ratledge and Dover 2000).
  - *NilC* est fixée à la membrane externe et tournée vers le périplasma<sup>b</sup> (Cowles and Goodrich-Blair 2004). Elle présente des régions similaires à un précurseur d'Oligopeptide Binding Protein de *Bacillus subtilis*, une flagelline d'*Escherichia coli* et une piline de *Salmonella enterica*.
  - *NilD* présente, entre autres, des homologies avec l'ADN-polymérase III d'*E. coli*.

Les mutants *nilB*<sup>-</sup>, *nilC*<sup>-</sup> et dans une moindre mesure *nilD*<sup>-</sup> sont incapables de coloniser la vésicule du nématode : ces gènes sont donc **nécessaires** à la reconnaissance de *X. nematophila* par *S. carpocapsae*. Les gènes *nilA*, *B* et *C* (dont l'expression est réprimée par *Lrp* et *NilR*) sont présents uniquement chez *Xenorhabdus nematophila*. Les auteurs ont montré que d'autres espèces de *Xenorhabdus*, qui ne sont normalement pas retenues par *Steinernema carpocapsae*, le deviennent lorsqu'on les transforme avec un plasmide portant les gènes *nilABC* (Cowles and Goodrich-Blair 2008). Ceci prouve que ces gènes sont **suffisants** pour la reconnaissance spécifique de *X. nematophila* par *S. carpocapsae*.

<sup>a</sup>Agent de rhinopharyngites et de méningites.

<sup>b</sup>Le périplasma est l'espace séparant les deux membranes, externe et interne ou cytoplasmique. Il contient la paroi muréique (peptidoglycane).

## 2. L'évolution des symbioses, entre coopération et conflits

### 2.1. Le continuum mutualisme-parasitisme : au-delà du concept, une réalité.

Nous avons donné, en introduction, des exemples de transitions évolutives du parasitisme vers le mutualisme et *vice-versa*, qui indiquent que ce continuum existe à l'échelle évolutive chez certaines associations. À la lumière de nos résultats nous montrons, dans ce qui suit, que ce continuum évolutif est permis ou facilité par une communauté de mécanismes physiologiques et moléculaires.

### 2.1.1. Des variations plastiques de coûts et de bénéfices

Nos résultats ont montré, chez le nématode *Steinernema carpocapsae*, un **continuum de coûts et de bénéfices**, tous deux reliés à une variable quantitative : le nombre de symbiotes bactériens par nématode. La variabilité que nous avons observée sur ce trait semble être plastique, on peut donc s'attendre à ce qu'il varie en fonction des conditions environnementales comme cela a déjà été suggéré par Flores-Lara et al. (2007). Loin d'être figée, la résultante globale de la symbiose pour chaque partenaire serait dynamique, et avec elle la nature de l'interaction.

Plusieurs symbioses mutualistes exhibent un bilan coûts-bénéfices variable selon l'environnement. Ces «mutualismes conditionnels» (Bronstein 1994 ; de Mazancourt et al. 2005), peuvent être illustrés par des symbioses fortement bénéfiques qui sont relâchées en conditions favorables. Ainsi, la mycorhization de certains conifères (pin, épicéa) est inhibée par un apport de phosphore ou d'azote dans le sol (Björkman 1940). De même, la Fabacée *Medicago sativa* forme beaucoup moins de nodules à *Rhizobium* (bactérie fixatrice d'azote atmosphérique) lorsque le sol est enrichi en nitrates (Munns 1968). Enfin, le nombre de cyanelles fixatrices d'azote par cellule diminue dans les milieux enrichis en nitrates chez la diatomée *Rhopalodia gibba* (Deyoe et al. 1992). Ces relâchements de la symbiose résultent probablement du fait qu'en conditions favorables, les bénéfices à être associé sont moindres, ce qui révèle les coûts de l'association. De la même façon, nous avons montré dans le chapitre 2 de la première partie qu'en conditions favorables (grandes fratries), les nématodes ont besoin de moins de bactéries pour réussir leur phase parasitaire.

Au-delà du relâchement de l'association, la labilité de la nature de l'interaction peut aller plus loin encore, avec transition plastique d'une interaction mutualiste à une véritable exploitation. C'est le cas des nématodes entomopathogènes qui, au cours de leur cycle de développement, exploitent leurs symbiotes par prédation, puis les retiennent dans leur tube digestif avant de sortir du cadavre d'insecte. En effet, pendant la phase parasite, les nématodes se nourrissent de leurs bactéries symbiotiques, et la colonisation de la vésicule des deuxièmes stades larvaires, qui se transformeront en stades infestants, requiert l'arrêt de la digestion des symbiotes. Les mécanismes sous-jacents à ce changement de comportement du nématode envers ses bactéries demeurent inconnus.

C'est aussi le cas des symbioses qui associent fourmis et pucerons. Dans ces interactions, les fourmis élèvent des pucerons suceurs de sève et bénéficient du miellat qu'ils excrètent. Elles complètent leur régime en protéines par prédation. Les pucerons bénéficient de la protection anti-prédateurs et des soins aux descendants que leur assurent les fourmis : il s'agit d'un mutualisme. Toutefois, les fourmis peuvent changer leur comportement envers les pucerons en fonction des conditions environnementales. En particulier, elles consomment leurs pucerons si des sucres sont disponibles par ailleurs, par exemple dans les nectaires extra-floraux des plantes alentour (Rosengren and Sundström 1991 ; Offenberg 2001). L'interaction mutualiste vire donc à l'exploitation par prédation. Cet exemple confirme que la limite entre mutualisme et exploitation est loin d'être nette. Selon C. Combes, «dans beaucoup de cas que l'on classe dans le mutualisme, l'hôte (c'est-à-dire celui qui sert d'habitat à l'autre) est tout simplement le véritable

parasite». Smith (1992) va jusqu'à écrire que «dans le parasitisme, les hôtes sont exploités par les parasites ; dans les mutualismes, les hôtes exploitent toujours leurs mutualistes, bien qu'une exploitation simultanée de l'hôte par le mutualiste puisse exister dans certaines associations».

### 2.1.2. Des mécanismes moléculaires communs aux mutualistes et aux pathogènes

**Le cas d'école : la symbiose *Rhizobium*-Fabacées.** Chez les Fabacées, la comparaison entre les symbiotes bactériens du genre *Rhizobium* et d'autres micro-organismes invasifs pour les plantes est courante (Djordjevic et al. 1987 ; Long and Staskawicz 1993 ; Downie 1994 ; van Rhijn and Vanderleyden 1995). Les observations ci-dessous justifient cela.

1. La rhizobitoxine, un dérivé d'acide aminé, décrite comme une phytotoxine car elle provoque la chlorose chez le soja, est à la fois produite par *Burkholderia andropogonis*, pathogène de plantes, et par *Bradyrhizobium elkanii*, symbiote de Fabacées ; dans ce dernier cas, elle favorise la formation des nodosités chez le siratro<sup>5</sup> (Sugawara et al. 2006).
2. L'expression de certains gènes bactériens codant des protéines de surface putatives est réprimée dans la plante. C'est en particulier le cas de *ropA*, gène très similaire à un gène de *Brucella abortus*, pathogène envahissant les cellules animales (de Maagd et al. 1994).
3. Certaines souches de *Rhizobium* possèdent un système de sécrétion de type III fonctionnel. Ce système, véritable seringue moléculaire, permet l'injection de molécules effectrices dans la cellule-cible. Il est très fréquent chez les pathogènes (agent de la peste, salmonelles) et les gènes qui le codent sont souvent rassemblés avec d'autres gènes de virulence sur des îlots de pathogénicité (Hentschel et al. 2000). Chez certaines souches de *Rhizobium*, ce système est codé par un gène appartenant à un îlot de symbiose et l'étude de mutants montre qu'il a un rôle dans la nodulation (Marie et al. 2001).

Le fait que des systèmes régulant la symbiose chez certaines bactéries (mutualistes) interviennent dans la pathogénicité chez d'autres a été décrit en dehors des *Rhizobium*. Un dérivé d'acide aminé, une homosérine lactone, est le signal de *quorum-sensing* qui induit la bioluminescence chez *Vibrio harveyi*. Au-delà d'une certaine densité bactérienne dans l'organe lumineux des calmars, ce trait symbiotique est en effet exprimé (Visick 2005). Cette même molécule augmente la pathogénicité de *Xenorhabdus nematophila* envers l'insecte en augmentant la sécrétion de lipases et en réprimant l'activité phénoloxydase dans l'hémolymphe (Dunphy et al. 1997).

Cette communauté de moyens entre bactéries pathogènes et bactéries mutualistes est probablement la trace d'une parenté phylogénétique. Autrement dit, les traits mutualistes des unes et les traits pathogéniques des autres sont homologues.

**Quand on est à la fois symbiote de nématodes et parasite d'insectes...** Peut-être en raison de la difficulté d'expérimenter sur des métazoaires par rapport à des bactéries, la bibliographie est très déséquilibrée en défaveur du partenaire nématode... c'est pourquoi nous nous placerons

---

<sup>5</sup>Légumineuse fourragère tropicale. Nom scientifique : *Macroptilium atropurpureum*.

ici du point de vue de la bactérie. Les exemples suivants montrent que chez *Photorhabdus luminescens*, symbiote du nématode *Heterorhabditis bacteriophora*, comme chez *Xenorhabdus*, certains gènes sont requis aussi bien pour la virulence envers l'insecte que pour la symbiose avec le nématode.

Les bactéries de l'espèce *Photorhabdus luminescens* mutées dans l'opéron *pbgPE* sont incapables de coloniser leurs nématodes et ont une virulence atténuée envers l'insecte (Bennett and Clarke 2005) (voir encadré 3 p. 84 pour plus de détails). Chez les Salmonelles, cet opéron intervient dans une modification de lipopolysaccharides (LPS) membranaires, ce qui leur confère une résistance à des antibiotiques, dont des peptides antimicrobiens (Gunn et al. 1998). On peut penser que la modification, chez les bactéries mutantes, de ces molécules de surface, affecte en outre la reconnaissance spécifique par les nématodes, donc leur colonisation par les symbiotes. Alternativement, les mutants pourraient être incapables de coloniser le nématode car ce dernier a une immunité innée comprenant des peptides qui ressemblent à des peptides antimicrobiens (Froy 2005). Les mutants bactériens ne résisteraient donc ni aux peptides antimicrobiens de l'insecte ni à ceux de leur partenaire symbiotique. Ces peptides du nématode pourraient lui permettre de sélectionner ses bactéries, mécanisme plausible de la spécificité de la symbiose (Goodrich-Blair and Clarke 2007).

Le mutant *exbD*<sup>-</sup> de *Photorhabdus luminescens* a un import de fer altéré, une virulence réduite envers l'insecte et ne favorise plus la croissance et la reproduction du nématode (Watson and Joyce 2005). Ce gène code une sous-unité d'un complexe de transport actif de petites molécules, comme les sidérophores ; le fer régulerait l'expression de peptide-synthases dont les produits pourraient être nécessaires à l'interaction avec le nématode (Joyce et al. 2006) et à la virulence lors de l'infection de l'insecte (Watson and Joyce 2005).

Les recherches sont moins avancées sur les bactéries du genre *Xenorhabdus* que chez *Photorhabdus*. *Xenorhabdus nematophila* offre un des rares exemples de co-régulation des pouvoirs pathogène et symbiotique. Les mutants *lrp*<sup>-</sup>, évoqués dans l'encadré 2 à cause de leur incapacité à coloniser la vésicule du nématode (Heungens et al. 2002), sont également incapables d'immuno-déprimer l'insecte (Cowles et al. 2007). Ce gène régulerait donc positivement la symbiose et la pathogénicité.

Dans tous les exemples précédents, les mutants *perte de fonction* sont à la fois moins virulents envers l'insecte et moins aptes à former une symbiose avec les nématodes : les produits des gènes concernés affecteraient positivement ces deux fonctions. Terminons par un exemple qui se démarque de cela. Les mutants *hexA*<sup>-</sup> de *Photorhabdus luminescens* permettent un meilleur succès reproductif des nématodes *H. bacteriophora* : la protéine *HexA* est un répresseur de gènes importants dans la symbiose, notamment pour la production de cristaux protéiques, possibles ressources pour les nématodes<sup>6</sup>, et pour la survie bactérienne en phase stationnaire. De

---

<sup>6</sup>Les *P. luminescens* mutants dans les gènes codant les inclusions protéiques bactériennes ne favorisent plus le développement de leur partenaire *Heterorhabditis bacteriophora* (Bintrim and Ensign 1998). En revanche, le bénéfice à l'association pour *Steinernema carpocapsae* n'est pas altéré s'il est associé à la bactérie *X. nematophila* mutante sur *pixA*, un gène codant ces mêmes inclusions protéiques (Goetsch et al. 2006). Ceci pourrait d'ailleurs fournir une explication mécanistique à la différence de fonctionnement (caractère obligatoire ou facultatif de la

plus, ces mutants *hexA*<sup>-</sup> ont une virulence atténuée envers l'insecte (Joyce and Clarke 2003). Ainsi, la protéine *HexA*, à la fois réprime la fonction symbiotique et promeut la fonction pathogène (Joyce et al. 2006). Voilà un bel exemple de pléiotropie antagoniste conduisant chez la bactérie à un compromis entre ces deux fonctions ! Cette conclusion est complexifiée par des données préliminaires qui montrent que les mutants *hexA*<sup>-</sup> colonisent moins les IJs que les *P. luminescens* sauvages. La même protéine réprime donc les gènes favorisant le développement du nématode et active les *fonctions d'invasion*, que ce soit de l'insecte ou du nématode.

### Encadré 3. Les systèmes régulateurs à deux composantes.

Ces systèmes, très répandus chez les bactéries, leur permet de percevoir leur environnement et de réagir en fonction. Ils se composent d'un senseur (une kinase) et d'un effecteur (un régulateur de l'expression génique). Ce type de système régulateur à deux composantes intervient souvent dans la virulence des pathogènes. Chez *Photobacterium luminescens* comme chez les Salmonelles, l'expression de l'opéron *pbgPE* est contrôlée par le système régulateur à deux composantes *PhoP – PhoQ*. Les mutants *PhoP*<sup>-</sup> de *P. luminescens* sont d'ailleurs, comme les mutants *pbgPE*<sup>-</sup>, plus sensibles aux peptides antimicrobiens (Derzelle et al. 2004) et moins virulents envers l'insecte (Bennett and Clarke 2005). Les mutants *PhoP*<sup>-</sup> de *Xenorhabdus nematophila* sont, eux aussi, plus sensibles aux peptides anti-bactériens mais gardent en revanche leur entière virulence envers l'insecte, preuve que leur échappement vis-à-vis du système immunitaire ne repose pas sur la modification des LPS. Chez les Salmonelles, ce système *PhoP – PhoQ* régule d'ailleurs aussi l'expression du système de sécrétion type III, acteur de la pathogénicité, qui injecte divers effecteurs dans la cellule-hôte.

**Diversité des interactions, unité des mécanismes** Ces systèmes régulateurs à deux composants interviennent aussi dans la symbiose : chez *Rhizobium meliloti*, le système *fixL/J* induit la transcription d'une quinzaine de gènes impliqués dans la fixation de l'azote. Chez *Xenorhabdus nematophila* il existe, en plus de *phoP – phoQ*, un deuxième système de ce type : *ompR – envZ*. Ce dernier co-régule la motilité (via des protéines flagellaires), la sécrétion d'exoenzymes (protéases, lipases) et la production d'antibiotiques (hémolysines) (Kim and Forst 2005 ; Park and Forst 2006). Ainsi, l'expression de protéines intervenant dans la symbiose (flagellines permettant la colonisation de la vésicule du nématode, exoenzymes permettant la digestion du cadavre d'insecte) et dans la pathogénicité (exoenzymes et hémolysines) est régulée par un mécanisme moléculaire commun.

Ces exemples montrent que les mêmes mécanismes moléculaires sont utilisés pour des fonctions opposées : parasitisme et mutualisme, ce qui indique peut-être l'existence de contraintes<sup>7</sup> sous-jacentes à cette économie d'échelle et de moyens. Le nombre d'outils serait limité, mais pas les façons de s'en servir. Laissons Hentschel et al. (2000) conclure cette partie : «Le passage en revue des éléments génétiques et régulateurs intervenant dans les symbioses parasites et mutualistes n'offre apparemment aucun principe général qui justifie leur distinction».

## 2.2. Des conflits d'intérêts à l'instabilité

La section précédente a montré que la communauté des mécanismes moléculaires régulant les traits mutualistes et pathogènes autorise les associations symbiotiques à se déplacer sur un continuum parasitisme-mutualisme. Dans la nature, des transitions évolutives pourront donc avoir lieu si les pressions de sélection qui s'exercent sur la symbiose changent de sens. Le sens de ces pressions de sélection dépend, lui, du rapport coûts - bénéfices pour chacun des partenaires. Nous avons montré, chez *Steinernema carpocapsae*, que ces variations de coûts et bénéfices induisent un compromis qui signe un conflit d'intérêts entre les partenaires. Ce conflit concerne, sur notre modèle, le nombre de bactéries portées par les nématodes en phase libre. S'il est suffisamment sévère, il pourrait favoriser l'apparition de tricheurs dans les populations. On peut tricher en exploitant le partenaire auquel on était précédemment bénéfique, voire en le quittant tout en continuant à profiter des bénéfices. Nous illustrons successivement ces deux possibilités.

Les cas de tricherie par exploitation directe sont les plus documentés dans la littérature. Dans les symbioses figuiers-Blastophages, les guêpes pollinisent activement les inflorescences et y pondent. Récemment, une équipe chinoise a trouvé, sur les mêmes arbres voire dans les mêmes fruits que des guêpes pleinement mutualistes, des espèces présentant des traits mutualistes atténués : faible taux de pollinisation, poches à pollen et peignes coxaux<sup>8</sup> réduits, mais qui pondent autant que les premières (Peng et al. 2008). Elles retirent donc autant de bénéfices de l'association avec le figuier mais trichent sur les bénéfices qu'elles lui apportent. De même, les *Yuccas* sont activement pollinisés par les papillons du genre *Tegeticula* qui pondent dans les fleurs et bénéficient de l'abri (fruit) et de la nourriture (graines) pour leurs chenilles.

---

<sup>7</sup>Du fait de son ambiguïté, le terme *contrainte* sera utilisé avec prudence dans ce qui suit. Au sens strict, une contrainte est une explication à la limitation de variabilité d'un patron qui vient d'en dehors du contexte local (Stearns 1986). S.J. Gould a renforcé cette définition : les contraintes sont ces sources de changement, et ces limitations aux changements, qui ne sont pas dues à l'action de causes canoniques déjà établies au sein d'une théorie. Elles dirigent les autres types de changement, inexplicables par la cause établie et restreignent les changements dûs à cette cause (Gould 1989). En évolution, la théorie établie est le darwinisme, et la cause canonique, la sélection naturelle. Dans ce cadre, le terme *contrainte* est à réserver à des patrons non-adaptatifs. Considérant le triangle de Seilacher (1970), qui représente les trois origines des propriétés des organismes (phylogénétique, structurelle et fonctionnelle), S.J. Gould précise que seules les deux premières sont des contraintes : la première résulte de la contingence historique ; la deuxième est la conséquence des propriétés universelles des matériaux de base. Le pôle fonctionnel, quant à lui, correspond à l'adaptation. Remarquons que ces contraintes, phylogénétiques et structurelles, s'expriment en particulier au cours du développement embryonnaire, où elles ont été abondamment étudiées.

<sup>8</sup>Certains pollinisateurs du figuier prélèvent activement du pollen avec leurs pattes avant et le déposent dans des poches à pollen situées sous le thorax. Les peignes sont situés sur le premier segment (coxa) des pattes avant de la guêpe et permettent de remplir les poches à pollen.



Cette symbiose est obligatoire pour les deux partenaires. Certaines espèces de *Tegeticula* ont secondairement perdu ces palpes et ne pollinisent pas les fleurs de *Yucca* (Addicott 1996) : elles échappent au coût de l'association tout en continuant à en bénéficier. Cependant, dans les deux exemples qui précèdent, les espèces non-mutualistes qui exploitent le mutualisme ne sont pas des tricheurs au sens strict, mais des *aprovechados* (profiteurs, *sensu* Soberon and Martinez 1985). Un tricheur au sens strict serait un *individu* qui exploiterait le comportement mutualiste de ses conspécifiques (Addicott and Tyre 1995). Si de tels tricheurs existent et qu'ils ne sont pas éliminés par la sélection naturelle, ils peuvent déstabiliser le mutualisme et entraîner l'espèce dans son ensemble vers le parasitisme. De tels tricheurs ont été décrits chez les *Tegeticula* pollinisateurs de *Yuccas* (Addicott and Tyre 1995).

Chez les couples némato-bactériens, le conflit d'intérêts s'exprime en phase libre : les bactéries ont intérêt à assurer leur transmission au prochain insecte infesté en étant assez nombreuses dans la vésicule du stade infestant ; les nématodes, eux, ont intérêt à ménager leur survie (donc leur probabilité de rencontre d'un hôte, condition de leur reproduction) en portant assez peu de bactéries.

Tricher, pour une bactérie, consisterait à se multiplier abondamment dans la vésicule du nématode. Toutefois, l'intérêt de cette stratégie pour les bactéries n'est pas clair compte tenu de leur mode de transmission. En effet, le plus souvent, un seul génotype bactérien colonise la vésicule des nématodes (Martens et al. 2003) : la sélection de parentèle entre individus clonaux devrait réduire l'avantage à se multiplier dans le nématode en l'absence de compétiteurs bactériens (Frank 1996).

Tricher, pour un stade infestant de nématode, consisterait à ne pas porter de bactéries. En effet, de tels nématodes aposymbiotiques ne fourniraient plus au partenaire bactérien le bénéfice du transport et de la rencontre des hôtes insectes. En revanche ils pourraient infester des insectes déjà parasités par des nématodes symbiotiques, donc profiter du bénéfice à être associé (mort et digestion de l'insecte) sans en avoir payé le coût (survie en phase libre). Ceci est d'autant plus vrai que les individus qui infestent le même insecte sont apparentés<sup>9</sup> : il suffit que quelques membres de la fratrie portent les bactéries pour que l'infestation fonctionne, donc la sélection de parentèle devrait augmenter l'avantage à ne pas porter de bactéries. Dans la nature, on trouve effectivement des nématodes qui ne portent pas de bactéries. Par exemple, chez *Steinernema carpocapsae*, 5 à 10% des stades infestants sont dépourvus de bactéries (Vivas and Goodrich-Blair 2001) ; de son côté, *Steinernema scapterisci* porte tellement peu de bactéries en moyenne que la majorité des stades infestants est probablement aposymbiotique (Sicard et al. 2003). Cette fréquence de nématodes aposymbiotiques peut correspondre à la fréquence d'un gène qui rendrait les nématodes non-porteurs. Elle peut aussi traduire le fait qu'à génotype constant, une proportion fixe des individus ne porte pas : on serait là dans un cas d'hétéromorphisme. Quelle qu'en soit l'interprétation, l'existence de ces individus montre que la sélection n'élimine pas

---

<sup>9</sup>Il serait intéressant de connaître la structure génétique des populations de nématodes pour accéder à l'appareillement moyen des nématodes infestant un même insecte, ce qui renseignerait sur l'avantage à tricher et la stabilité de la symbiose. Malheureusement, en l'absence de marqueurs génétiques intra-spécifiques chez les nématodes, ce genre d'étude est inaccessible pour le moment.

nécessairement les nématodes non porteurs. La question de la stabilité de ces mutualismes se pose d'autant plus.

### 2.3. Et pourtant elles tournent...

Malgré le conflit d'intérêts, que nous venons d'illustrer, les symbioses némato-bactériennes sont très répandues (Hominick 2002) et semblent stables à l'échelle évolutive. Ce dernier point peut être illustré par plusieurs indices de co-évolution qui indiquent que les deux partenaires sont en association depuis longtemps.

Nous avons déjà vu que les nématodes du genre *Steinernema* présentent une modification anatomique dans le tiers antérieur de leur tube digestif : la vésicule de Bird et Akhurst (Bird and Akhurst 1983) qui contient les bactéries symbiotiques (Figure 6). La formation de cette vésicule est innée : elle ne nécessite pas la présence des bactéries symbiotiques (Bird and Akhurst 1983 ; Flores-Lara et al. 2007). Elle est absente chez les nématodes non impliqués dans une symbiose bactérienne, ainsi d'ailleurs que chez les *Heterorhabditis*.

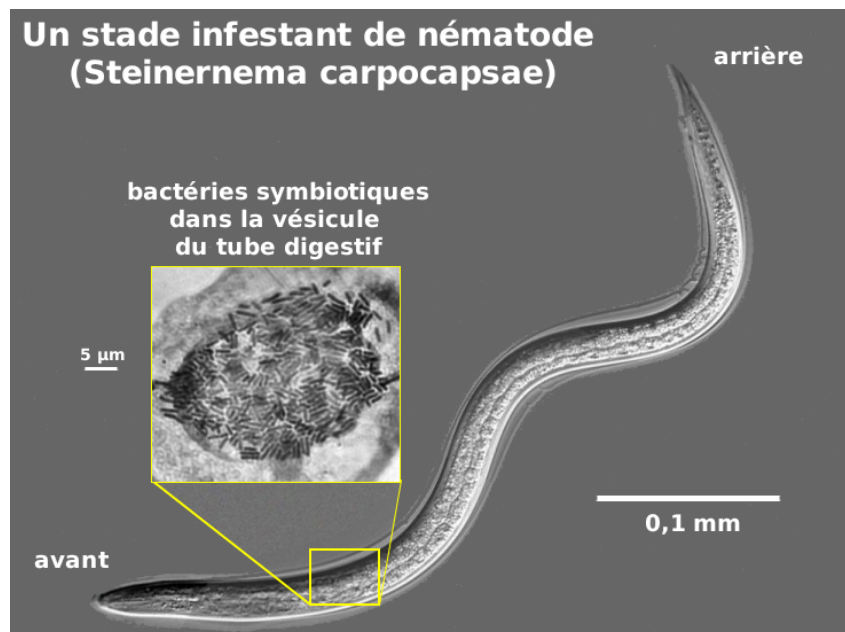


FIG. 6. Un stade infestant de *Steinernema carpocapsae* portant des bactéries symbiotiques. Image extraite du site du Donald Danforth Plant Science Center : [http : //xenorhabdus.danforthcenter.org/pix/fig3.jpg](http://xenorhabdus.danforthcenter.org/pix/fig3.jpg).

D'autre part, nous avons vu plus haut que la bactérie *Xenorhabdus nematophila* a un ensemble de gènes (*nil*) nécessaires et suffisants pour coloniser spécifiquement la vésicule du nématode *S. carpocapsae*. La co-évolution est probablement à l'origine de la présence de ces gènes de reconnaissance très spécifique entre partenaires.

Ces traits ne peuvent être compris que dans le cadre d'une relation symbiotique entre nématodes et bactéries. Comme dirait C. Combes, «l'évolution, c'est les autres» (Combes 1995 p. 173).

Comment, alors, concilier cette apparente stabilité des symbioses nématobactériennes avec le conflit d'intérêts démontré précédemment ? En particulier, pourquoi des nématodes tricheurs dépourvus de bactéries sont-ils si peu fréquents dans les populations de *Steinernema carpocapsae* ?

### 2.3.1. De l'alignement des intérêts...

On pourrait penser que la fréquence des tricheurs est limitée par la corrélation positive des valeurs sélectives de l'hôte et du symbiote. En effet, en plus des pressions de sélection réciproques évoquées plus haut, le nématode et la bactérie subissent des pressions de sélection communes, liées à leur mode de vie parasite d'insecte<sup>10</sup> : nématode et bactérie ne se multiplient que dans l'insecte. En fait, cette corrélation ne peut stabiliser le mutualisme que si elle existe aussi à l'échelle de chaque individu participant à la symbiose. Notamment, quelques tricheurs au milieu d'une population de symbiotes mutualistes doivent en ressentir les effets. Tant qu'en phase libre l'intérêt immédiat du nématode est de survivre et celui de la bactérie de se maintenir dans la vésicule, le conflit persiste.

Dans le cas d'une symbiose asymétrique, un des partenaires peut imposer cette corrélation à l'autre. C'est ce que l'on appelle la **sanction**, mécanisme particulièrement étudié sur deux modèles. Chez les Yuccas, Pellmyr and Huth (1994) ont montré que la maturation des fleurs en fruits est avortée si les fleurs contiennent trop d'oeufs de *Tegeticula*, entraînant la mort de ces derniers. Ainsi le Yucca contre-sélectionne les papillons qui l'exploitent. Remarquons que certaines espèces de *Tegeticula* contournent cette sanction en pondant dans les fruits plutôt que dans les fleurs, échappant ainsi à l'abscission<sup>11</sup> (Addicott 1996). Plus récemment, Kiers et al. (2003) ont montré que les nodules de Fabacées qui ne fixent pas d'azote sont sélectivement privés de ressources, notamment d'oxygène. De plus, la sanction est d'autant moins sévère que la quantité d'azote fixée (qui mesure l'investissement des bactéries dans la symbiose, leur coopérativité) est forte (Kiers et al. 2006) : l'intensité de la riposte serait modulable en fonction du bénéfice reçu. Par ailleurs, une étude théorique récente montre que, pour un niveau d'exploitation donné, ces sanctions augmentent en réponse à la sélection lorsque la densité des victimes potentielles diminue : en deçà d'une densité critique d'hôtes, le coût à trouver un autre hôte est tel que le symbiote n'a plus du tout intérêt à exploiter l'association (Johnstone and Bshary 2008). L'intensité de la sanction dépendrait donc, outre de celle de l'exploitation, des abondances relatives des deux partenaires et de la facilité à changer de partenaire. Dans les deux exemples précédents, la co-adaptation entre partenaires du mutualisme s'apparente à la course aux armements décrite dans les parasitismes. A une attaque du symbiote (forte taille de ponte, faible fixation d'azote) fait suite une riposte de l'hôte (abscission des fleurs sur-exploitées, sous-alimentation des nodules peu efficaces), éventuellement suivie d'une esquivance (changement de niche des *Tegeticula* : ponte tardive dans les fruits de Yucca). En réalité, le même type de mécanismes opère dans certains parasitismes. En effet, les parasites manipulateurs peuvent sélectionner un com-

<sup>10</sup>Ces pressions de sélection dues à l'insecte sont perceptibles dans les traits liés à la pathogénicité chez les deux partenaires de la symbiose, notamment la multitude des toxines bactériennes immuno-suppressives.

<sup>11</sup>En effet, seuls 10% des fruits surexploités sont éliminés par le Yucca, contre 90% des fleurs (Addicott 1996).

portement coopératif chez leur hôte en lui imposant un coût supplémentaire s'il n'obéit pas, ce qui permet le maintien de l'interaction. Cette stratégie mafieuse est notamment adoptée par les vachers à tête brune qui parasitent les nids d'autres oiseaux : 56% des nids de paruline orange (hôte) où l'œuf de vacher (parasite) a été rejeté sont saccagés par les vachers, contre 6% des nids où l'œuf de vacher a été accepté (Hoover and Robinson 2007). Les auteurs montrent qu'à nombre initial d'œufs-hôtes égal, les nids où l'œuf du parasite a été accepté contiennent plus de poussins-hôtes que les nids où il a été rejeté : la stratégie mafieuse du parasite favoriserait, en termes de succès reproductif, l'obéissance de l'hôte. Les sanctions évoquées ci-dessus dans les symbioses *Rhizobium*-Fabacées et *Yucca-Tegeticula* s'apparentent à une stratégie mafieuse inversée, de l'hôte contre son symbiote. En effet, les principaux pré-requis soulignés par Ponton et al. (2006) pour qu'une stratégie mafieuse puisse être sélectionnée, adaptés au cas des mutualismes, semblent remplis dans ces deux associations symbiotiques : (i) le niveau d'exploitation-sanction du symbiote par l'hôte doit être modulable, (ii) l'hôte doit être capable de détecter des différences de comportement du symbiote et (iii) le comportement coopératif doit être bénéfique pour le symbiote.

Nous n'avons pour le moment aucun argument expérimental indiquant l'existence de ripostes dans les associations nématode-bactérie, mais on pourrait supposer :

- une riposte des stades infestants de nématode envers les bactéries qui se multiplient trop dans sa vésicule (réponse immunitaire, privation de ressources...), en cas de compétition entre souches. Toutefois, nous avons vu précédemment que la colonisation de la vésicule des nématodes est quasi-clonale. Les bactéries ne devraient donc pas être sélectionnées pour se multiplier vite dans la vésicule et la sélection d'une riposte chez les nématodes est donc peu probable,
- beaucoup plus hypothétique, une riposte des bactéries envers les nématodes qui ne les retiendraient pas (plus grande sensibilité des nématodes aposymbiotiques aux nématicides bactériens produits dans l'insecte en phase parasite ?).

Chez les nématodes entomopathogènes, un autre mécanisme majeur pourrait aboutir à l'alignement des intérêts entre les partenaires de la symbiose : les **compétitions** au sein d'un hôte. Plusieurs exploiters de la niche insecte peuvent se retrouver en compétition : nématodes, mais aussi bactéries, virus et champignons entomopathogènes (Baur and Kaya 2001). Nous avons vu que plusieurs espèces de nématodes peuvent coexister en un même site (voir deuxième partie, chapitre 1 ainsi que Campbell et al. (1995)). Si, en plus d'être sympatriques, les couples nématodes-bactéries ont des spectres d'hôtes chevauchants, alors plusieurs espèces pourraient se rencontrer dans les mêmes insectes. La compétition pour la ressource insecte qui en résulte peut contribuer à défavoriser des tricheurs aposymbiotiques : un nématode dépourvu de bactéries se prive de nombreuses défenses (antibiotiques, nématicides) et de moyens d'exploitation de la ressource insecte (activités enzymatiques) qui pourraient l'avantager dans la compétition entre couples. En effet, Sicard et al. (2006) ont montré que les symbiotes bactériens peuvent complètement inverser l'issue de la compétition. Plus précisément, *Steinernema scap-*

*terisci* aposymbiotique exclut<sup>12</sup> compétitivement *Steinernema carpocapsae* aposymbiotique, mais c'est l'inverse si les nématodes sont associés à leur symbiote respectif. Ainsi, en l'absence de compétition, tricher est risqué puisqu'un génotype tricheur seul dans un insecte a un succès reproductif faible ; en contexte de compétition, tricher est encore plus risqué car un tricheur seul face à des compétiteurs symbiotiques aurait un succès reproductif nul. Le rôle évolutif des compétitions entre associations dans l'insecte peut d'ailleurs être décelé dans les multiples toxines de la bactérie *Xenorhabdus nematophila* qui s'attaque aussi bien à des bactéries du même genre (Thaler et al. 1995) voire de la même espèce (Tabart 2003), qu'à des nématodes (Samaliev et al. 2000 ; Han and Ehlers 1999).

Douglas (2008) propose un autre moyen de résoudre les conflits. La transmission verticale rend les intérêts des deux partenaires plus chevauchants. Toutefois, elle permet d'expliquer l'atténuation du conflit sur des traits du symbiote, mais pas sur des traits de l'hôte, qui pourrait continuer à tricher tout en transmettant verticalement son symbiote. Dans notre modèle biologique, la transmission quasi-verticale des bactéries n'éclaire donc pas la faible proportion de nématodes tricheurs. Elle est par contre déterminante pour comprendre l'évolution de la spécificité de la symbiose.

### 2.3.2. ... à la spécificité

Contrairement à ceux de la section 2.2, les mécanismes évoqués ci-dessus contribuent à verrouiller les associations par co-adaptations successives aux pressions de sélection imposées par un partenaire à l'autre. Les sanctions comme les compétitions ré-alignent de force les intérêts des partenaires en conflit. La spécificité dans les associations pourrait être une conséquence de ces pressions de sélection réciproques, surtout s'il s'agit d'associations anciennes. La spécificité présente à la fois des avantages et des inconvénients.

Commençons par les avantages. (i) Il est bénéfique de sélectionner des partenaires efficaces et peu coûteux car cela permet, dans une certaine mesure, d'éviter les tricheurs et les coûts qu'ils induisent (Sanders 2003) ; en ce sens la sanction est déjà une forme de spécialisation. (ii) La spécificité peut également être bénéfique car elle limite la compétition entre symbiotes au sein de l'hôte. L'importance des compétitions entre symbiotes pour la stabilité des mutualismes (voire la co-existence stable de tricheurs et de mutualistes) est soutenue par des travaux théoriques (Ferrière et al. 2002 ; 2007). Frank (1996) souligne que l'hôte n'a pas intérêt à avoir plusieurs génotypes de symbiotes car la compétition entre ces derniers peut être dommageable pour lui. Chez les nématodes entomopathogènes, nous avons vu que des toxines interviennent lors des compétitions entre bactéries dans l'insecte. Ces toxines, dont l'expression est en général induite par l'hémolymphe de l'insecte, pourraient aussi s'exprimer constitutivement, à un niveau plus bas, dans la vésicule des nématodes. De plus, sans faire appel aux toxines, une compétition entre bactéries sur le taux de multiplication entraînerait une déplétion plus rapide des réserves du nématode, compromettant sa survie. La compétition entre souches bactériennes semble effectivement nuisible aux stades infestants de nématodes, qui auraient intérêt à retenir

---

<sup>12</sup>Dans la plupart des cas, une seule espèce de nématode émerge des insectes infestés avec les deux espèces.

peu de clones de bactéries ce qui aurait pour effet de supprimer le conflit en phase libre. Nous avons déjà évoqué cet argument précédemment.

D'un autre côté, la spécificité pourrait paraître désavantageuse car elle revient, pour le partenaire regardant, à se fermer des portes en limitant le nombre de partenaires possibles. Ceci est particulièrement préjudiciable si l'augmentation de performances avec un partenaire diminue la performance avec les autres ou si le coût à trouver un partenaire très bénéfique est supérieur au bénéfice à s'associer avec un partenaire moins coopératif, ce qui est le cas si les partenaires sont rares ou si la stochasticité environnementale est forte. Ainsi, Hoeksema and Bruna (2000) supposent que les mutualismes très spécifiques sont assez rares dans la nature car ils ont une faible marge de manoeuvre pour répondre à des changements d'abondance ou de bénéfices fournis par les symbiotes. Toutefois, il existe un moyen de pallier la rareté du partenaire : la transmission verticale, qui permet de «capturer» les vrais mutualistes et de les transmettre à la descendance (Douglas 1998). Chez les nématodes entomopathogènes, la transmission des symbiotes est quasi-verticale : la bactérie qui sort de l'insecte descend de (l'une de) celle(s) qui y est (sont) rentrée(s). Les nématodes du genre *Steinernema* étant gonochoriques, au moins deux individus de sexe différent, portant chacun leurs symbiotes, doivent pénétrer dans l'insecte pour que l'infestation réussisse. Des transferts horizontaux de symbiotes sont possibles dans l'insecte, ce qui a été confirmé par une approche co-phylogénétique (Sicard 2003). Toutefois, ils ne seraient pas extrêmement fréquents car la capacité de dispersion des stades infestants est supposée faible (Hominick 2002) et, la distribution des insectes-hôtes étant souvent très agrégée (Tinbergen 1981 ; Dall et al. 1997), celle des nématodes le serait aussi (Downes and Griffin 1996 ; Bohan 2000), limitant la rencontre entre souches. Des études de génétique permettraient d'explorer la structuration spatiale des populations sur le terrain, mais sont pour le moment inaccessibles du fait de l'absence de marqueurs intra-spécifiques chez les nématodes.

Ainsi, les mécanismes invoqués précédemment pour aligner les intérêts des partenaires (sanction, choix du partenaire, transmission verticale) contribuent également à augmenter la spécificité dans les symbioses. Le degré de spécificité d'une association résulte de la balance entre tous ces effets, y compris ceux que les expériences omettent mais qui jouent vraisemblablement un rôle dans la nature : densités respectives des deux partenaires, stochasticité environnementale, influence d'autres organismes, parasites, prédateurs ou compétiteurs. Chez les nématodes entomopathogènes, cette balance semble différer entre espèces de *Steinernema* comme le montre le chapitre 2 de la deuxième partie. Ces résultats préliminaires suggèrent que *Steinernema carpocapsae* est plus spécifique que *S. feltiae*, que ce soit au niveau de la rétention ou de la reproduction. En effet, sur les souches bactériennes testées, *S. carpocapsae* ne retient que des souches de son symbiote *Xenorhabdus nematophila*, plus une souche de *X. griffiniae* (en très faible quantité par rapport au symbiote natif). De plus, sans considérer les souches de *X. nematophila*, il ne se reproduit qu'avec huit souches sur les 19 testées. *S. feltiae*, au contraire, est capable de retenir d'autres espèces que son symbiote naturel et, *X. bovienii* exclu, les 14 souches étrangères testées autorisent sa reproduction. Cette forte spécificité du couple *S. carpocapsae* - *X. nematophila* est cohérente avec les données de Sicard et al. (2004b) et avec l'existence de

gènes bactériens nécessaires et suffisants à la reconnaissance par le nématode (voir encadré 2 p.79-80), signes d'une étroite co-évolution. Paradoxalement, l'avantage à la spécificité peut être discuté sur cette espèce : Koppenhöfer et al. (1995) soulignent que la spécificité de *S. carpocapsae* est peut-être à l'origine de son désavantage, en compétitions symbiotiques, face à *S. glaseri*. Cette dernière espèce, en effet, est capable de se développer sur *Xenorhabdus nematophila*, le symbiote de *S. carpocapsae*, alors que *S. carpocapsae* serait moins tolérante envers des symbiotes non-natifs. Alternativement, cette différence pourrait être due au développement plus rapide<sup>13</sup> de *S. glaseri* dans l'hôte, qui priverait son compétiteur des ressources du cadavre d'insecte. Les données que nous avons obtenues sur *Steinernema feltiae* sont plus complexes que nos attentes : à la faible spécificité de la bactérie (qui s'associe avec des espèces de nématodes éloignées de *S. feltiae*) semblerait, au premier abord, correspondre la faible spécificité du nématode, capable de retenir et de bénéficier d'autres bactéries que son espèce native. Au niveau intra-spécifique, toutefois, les souches de la même espèce que le symbiote naturel sont retenues en moins grand nombre, et sont, pour certaines, neutres voire toxiques vis-à-vis de la reproduction, ce qui souligne l'existence d'une spécificité à très petit échelle chez *S. feltiae*. De plus, chez ce nématode, les spécificités de rétention et de reproduction ne semblent pas corrélées : certaines souches bactériennes sont très bénéfiques pour la reproduction mais ne sont pas du tout retenues ; d'autres sont retenues mais bloquent complètement la reproduction du nématode. Signe que ces deux niveaux de spécificité résultent de mécanismes physiologiques radicalement différents : reconnaissance moléculaire et interaction récepteur-ligand pour la rétention, adéquation chimique et métabolique entre les bactéries (toxines, enzymes) et les nématodes (résistance aux antibiotiques, assimilation des nutriments) pour la reproduction. Signe aussi que des pressions de sélection différentes ont agi sur ces deux niveaux de spécificité.

De façon plus générale, les différences de stratégies entre les espèces de nématodes étudiées pourraient être liées à l'existence du compromis qu'engendre la symbiose.

### 3. Conséquences évolutives du compromis

Nous avons vu au chapitre 2 de la première partie que les principaux traits d'histoire de vie des nématodes : réussite parasitaire, survie et rétention covarient. Si les corrélations entre ces traits sont génétiques, la ou les stratégie(s) fixée(s) à l'équilibre évolutif dépende(nt) de la forme de la courbe de compromis entre les traits considérés. Un équilibre polymorphe verrait la coexistence de deux stratégies dans la population : des nématodes portant beaucoup de bactéries, à forte reproduction et faible survie et des nématodes tricheurs portant peu de bactéries, survivant longtemps mais se reproduisant peu. Si une seule stratégie est fixée à l'équilibre, elle peut être pure ou mixte. Dans le premier cas (monomorphisme), le génotype code toujours la même stratégie ; dans le second (hétéromorphisme), il peut faire adopter à son porteur plusieurs stratégies alternativement.

---

<sup>13</sup>En effet, les insectes parasités par *S. glaseri* émettent des stades infestants sept jours après infestation, alors que *S. carpocapsae* met au moins dix jours à boucler son cycle (Poinar 1979).

### 3.1. Forme de la courbe de compensation et nature de l'équilibre évolutif

Une étude théorique, reprenant le modèle de Charnov (1979), a montré qu'une seule stratégie est évolutivement stable si la courbe de compensation est concave, alors qu'un branchement évolutif se produit si elle est convexe (de Laguérie et al. 1993). La même étude théorique a montré que cette courbe est d'autant plus convexe (compromis plus sévère : pente initiale forte) que l'environnement est pauvre<sup>14</sup> : en conditions restrictives, on ne peut vraiment pas être bon partout et mieux vaut abandonner une fonction au profit de l'autre plutôt que d'essayer de faire (mal) les deux. Cette étude est la généralisation d'un modèle antérieur élaboré par Charnov et al. (1976) pour expliquer l'apparition de la diœcie chez les plantes. En effet, la grande majorité (96%) des plantes sont hermaphrodites, c'est-à-dire que leurs fleurs produisent à la fois des gamètes mâles et des gamètes femelles. Des stratégies alternatives existent :

- la diœcie, du grec  $\delta\iota$ , deux et  $\omicron\lambda\lambda\omicron\varsigma$ , maison. Chez les plantes dioïques, les fleurs sont unisexuées (mâles OU femelles) et les deux sexes sont portés par des plants différents,
- la monœcie (du grec  $\mu\acute{o}\nu\omicron\varsigma$ , seul). Chez les plantes monoïques, les fleurs sont unisexuées (mâles OU femelles) et chaque plant porte à la fois des fleurs mâles et des fleurs femelles.

Charnov et al. (1976), en travaillant sur un modèle d'allocation de ressources entre fonctions mâle et femelle, ont montré que la diœcie est évolutivement stable si la courbe de compensation est convexe, et que l'hermaphroditisme est fixé à l'équilibre si cette courbe est concave. Pour des niveaux de ressources intermédiaires mais insuffisants pour maintenir uniquement des hermaphrodites, des individus femelles et des individus hermaphrodites coexistent à l'équilibre évolutif. Ainsi, en milieu défavorable, des stratégies spécialistes seraient favorisées. L'étude de plantes chez qui la proportion d'unisexués *versus* hermaphrodites peut changer plastiquement selon l'environnement (Dorken and Mitchard 2008) ou au cours de la vie de l'individu (Huang et al. 2002) tendent à le montrer. Toutefois, l'évolution de la diœcie (et de ses pendants andro- et gynodioïques) est très vraisemblablement liée à d'autres déterminants, nucléo-cytoplasmiques notamment (Jacobs and Wade 2003).

L'accès expérimental à la forme de la courbe de compromis nécessite vraisemblablement beaucoup plus de points que ce que nous avons obtenu dans le chapitre 2 de la première partie. Cette forme, à son tour, dépend de déterminants génétiques et de la forme de la courbe de réponse d'un trait à la quantité totale de ressources disponibles. Il serait intéressant d'explorer la forme de cette courbe de compromis par sélection expérimentale de nématodes en milieux riche (insectes abondants) et pauvre. On s'attendrait à une augmentation de la rétention en milieu riche, la survie entre deux infestations n'étant pas déterminante. En milieu pauvre, deux forces jouent en sens opposés ce qui rend délicates les prédictions : la rareté des hôtes (i) augmente le temps moyen entre deux infestations, sélectionnant ainsi de bons survivants portant peu de bactéries, (ii) augmente la compétition intra-hôte entre nématodes, sélectionnant ainsi

---

<sup>14</sup>Ceci n'est vrai que si au moins l'un des deux traits répond de façon sigmoïde à la quantité de ressources disponibles. Si ce n'est pas le cas, la courbe de compensation sera soit linéaire soit toujours concave dans le modèle considéré.



une virulence plus forte, donc probablement une rétention plus élevée. Conformément aux prédictions de Fenton and Hudson (2002) en environnement imprédictible, on pourrait s'attendre à fixer une stratégie mixte à l'équilibre.

## 3.2. Diversité de stratégies chez les nématodes entomopathogènes

Nous avons déjà vu que les nématodes diffèrent sur le nombre de bactéries qu'ils portent et les bénéfices et coûts liés à l'association avec des bactéries. *Steinernema scapterisci* exhibe notamment une rétention si faible que la population est, vraisemblablement, constituée d'une majorité d'individus qui ne portent pas de bactéries et de quelques individus qui en portent : on pourrait suspecter de l'hétéromorphisme chez cette espèce. Outre les traits de valeur sélective étudiés dans mes expériences, d'autres traits d'histoire de vie sont variables entre espèces de nématodes et pourraient affecter les premiers.

### 3.2.1. Chasseurs itinérants et chasseurs à l'affût

Deux stratégies de recherche d'hôtes ont été décrites chez les nématodes entomopathogènes. Certaines espèces, comme *Steinernema carpocapsae*, attendent passivement le passage d'insectes hôtes : elles chassent à l'affût. Ces nématodes se rencontrent plutôt à la surface du sol, là où le déplacement des insectes est aisé. D'autres nématodes, au contraire, sont très mobiles et recherchent activement des hôtes dans le sol ; c'est le cas de *S. glaseri* (Lewis et al. 1992). Il existe aussi une stratégie mixte, qui est en fait la plus répandue (Campbell et al. 2003) : *S. rarum* chasse à la fois des hôtes mobiles et des hôtes sédentaires. Une étude récente a montré que les nématodes peuvent parasiter des insectes déjà morts et que ce trait diffère entre *Steinernema feltiae* et *S. affine*<sup>15</sup> (San-Blas et al. 2008) ; ces différences pourraient être interprétées en termes de différences de stratégies de chasse. Ces stratégies peuvent médier la compétition inter-couples : ainsi *S. carpocapsae* gagne face à *S. glaseri* à la surface du sol, et c'est l'inverse en profondeur (Koppenhofer et al. 1996).

Les nématodes qui chassent passivement, à l'affût, peuvent peut-être se permettre de porter plus de bactéries que les chasseurs itinérants. En effet ces derniers dépensent probablement plus d'énergie en phase libre pour assurer leur mobilité ; dans ces conditions, porter des bactéries devrait représenter un coût plus important. Dans une étude théorique, Fenton and Hudson (2002) ont déjà émis l'hypothèse d'un coût à être infectieux (c'est-à-dire, dans leur cas, mobile et capable de détecter et d'infester les hôtes). Il serait intéressant de tester si les chasseurs à l'affût sont aussi ceux qui portent beaucoup de bactéries, et inversement si les chasseurs itinérants portent moins de bactéries.

---

<sup>15</sup>Sur le terrain, *S. feltiae* parasiterait autant les insectes vivants que morts alors que *S. affine* parasiterait moins les insectes morts.

### 3.2.2. L'infectivité échelonnée, ou l'art de répartir le risque

L'infectivité échelonnée (*phased infectivity*) a été observée chez *Heterorhabditis bacteriophora* (Campbell et al. 1999) et *Heterorhabditis megidis* (Ryder and Griffin 2003). Chez ces deux espèces, tous les nématodes qui sortent d'un cadavre d'insecte ne sont pas infestants en même temps, et les derniers nématodes qui en sortent ne seront infestants qu'après un temps de latence. Récemment, Riveros et al. (2007) ont montré que les nématodes de première génération (émergence précoce) sont plus infestants que les nématodes de deuxième génération chez *Steinernema rarum*.

Des travaux théoriques ont montré que l'adoption d'un pouvoir infectieux sub-maximal est avantageuse<sup>16</sup> s'il y a un coût à être infectieux<sup>17</sup> et si les hôtes sont rares, car elle permet d'augmenter la survie entre deux cycles parasitaires (Fenton and Hudson 2002). Une autre prédiction du modèle est que la variance d'infectivité entre individus augmente avec la stochasticité de l'environnement, augmentant ainsi la probabilité qu'au moins quelques parasites infectent un hôte. Plus l'abondance des hôtes est imprédictible, plus les stratégies mixtes où coexistent des parasites peu infectieux (très abondants) et très infectieux (peu abondants) sont favorisées. On retrouve ici la prédiction des modèles de Charnov.

Chez les nématodes entomopathogènes, seulement 20 à 30% des stades infestants seraient immédiatement infestants<sup>18</sup> (Fan and Hominick 1991 ; Bohan and Hominick 1996). Cette stratégie, en plus de limiter le risque d'échec global des nématodes sortant d'un même insecte, limite la compétition intraspécifique entre apparentés.

### 3.2.3. Niveau d'exploitation de l'hôte

Dans ce qui suit nous montrons (i) que l'exploitation de l'hôte insecte par les nématodes est très intense et (ii) qu'elle est variable entre espèces de *Steinernema* selon leur vitesse de développement, comme entre *Heterorhabditis* selon la proportion d'individus mâles *versus* hermaphrodites.

Les nématodes parasites d'insecte sont de très bons reproducteurs : quelques nématodes introduits dans une chenille d'environ 1 cm de long et 0,3 cm de diamètre sont à l'origine de quelques centaines de milliers de descendants ! Ce succès reproductif énorme est monnaie courante chez les parasites (revue dans Combes (2001), p. 183). Dans le cas des nématodes entomopathogènes, il est permis par la mort de l'hôte<sup>19</sup> et l'exploitation quasi-totale de la ressource, qui est la stratégie avantageuse en milieu fragmenté (Charnov 1976). En effet, selon la théorie de l'*optimal foraging*, les prédateurs ont intérêt à rester dans une parcelle où la chasse est fructueuse plutôt que de perdre du temps à chercher des proies dans une autre parcelle, et

<sup>16</sup>En termes de taux de reproduction de base du parasite ( $R_0$ ).

<sup>17</sup>Les auteurs introduisent explicitement un compromis survie-infectivité dans leur modèle. Ce type de compensation entre virulence (infectivité) et transmissibilité (dépendante de la survie) est largement étudié chez les pathogènes, qui ne pourraient augmenter la première qu'au détriment de la seconde.

<sup>18</sup>L'absence de pouvoir infectieux des nématodes a deux origines : intrinsèque et résultant de signaux inhibiteurs émis par les insectes infestés (Fairbairn et al. 2000).

<sup>19</sup>Cette caractéristique rapproche les nématodes entomopathogènes des parasitoïdes.

ce d'autant plus que le coût à la dispersion (distance entre parcelles) est fort. Dans le sol, les hôtes insectes sont une ressource morcelée pour leurs parasites<sup>20</sup>, qui auraient intérêt à exploiter un hôte à fond avant de quitter le cadavre, surtout si les insectes sont rares. C'est la stratégie que des nématodes entomopathogènes semblent avoir adoptée : en effet, chez *S. carpocapsae* symbiotique, les premiers nématodes sont émis une dizaine de jours à peine après l'infestation, mais d'autres nématodes émergent du cadavre pendant au moins deux semaines supplémentaires en conditions de laboratoire. Ceci est moins vrai chez les individus aposymbiotiques de *Steinernema carpocapsae*, qui sortent plus tard de l'insecte et pendant plus longtemps que les symbiotiques (observation personnelle), et qui paient un coût moindre à la dispersion. Le décalage temporel dans la sortie des nématodes pourrait d'ailleurs limiter la compétition entre individus apparentés, de la même manière que l'inféctivité échelonnée décrite précédemment.

Les chenilles infestées par *Steinernema feltiae* émettent des descendants dès 7 jours après infestation, et il ne reste guère de la chenille, après l'émergence des nématodes, qu'une cuticule vidée de sa substance (observation personnelle). *Steinernema feltiae* est l'une des espèces de *Steinernema* les plus fréquentes dans le monde (Hominick et al. 1997). Serait-ce parce que sa grande vitesse de développement lui confère une compétitivité supérieure à d'autres ?

Chez les nématodes du genre *Heterorhabditis* la production d'individus unisexués est facultative. Deux stratégies coexistent : la production de mâles et d'hermaphrodites, favorisant la diversité génétique de la descendance et éventuellement l'adaptation à de nouvelles conditions, et la stratégie hermaphrodite pure, qui augmente le nombre total de descendants. En cas de stress nutritif, certaines souches de nématodes produisent proportionnellement plus de mâles, d'autres au contraire, plus d'hermaphrodites au détriment des mâles, donc plus de descendants, ce qui augmenterait les chances qu'au moins quelques-uns réussissent une infestation. La culture des nématodes *in vitro* avec différentes souches de *Photorhabdus* montre que le passage de l'une à l'autre dépend également de la souche bactérienne utilisée. Une des souches, notamment, n'autorise que la production d'hermaphrodites (Rincones et al. 2001 pour tout le paragraphe).

Ainsi, différentes stratégies d'exploitation de l'hôte se rencontrent chez les nématodes. Elles dépendent de la vitesse de développement du nématode, directement dépendante de la qualité et de la quantité de ressources disponibles à un instant t, et de la souche de bactérie (qui peut déterminer en partie la nature et la quantité des ressources disponibles pour le développement du nématode).

## Conclusion

Cette thèse apporte quelques informations sur le fonctionnement des symbioses nématobactériennes. Les intérêts des deux partenaires semblent alignés en phase parasite, lors de laquelle nématodes et bactéries se multiplient. L'asymétrie de l'association, obligatoire pour la

---

<sup>20</sup>D'autant que les insectes ont souvent une distribution agrégée (Tinbergen 1981 ; Dall et al. 1997).

bactérie (totalement dépendante de la survie du nématode pour sa transmission) mais parfois facultative pour le nématode, n'empêche pas l'apparition de coûts en phase libre, dépendants de la charge symbiotique. Le conflit d'intérêts pour l'allocation des ressources des stades infestants se manifeste par un compromis entre traits du nématode qui, s'il a une base génétique, pourrait expliquer la diversité des modalités et de la spécificité d'association rencontrée dans la nature.

Toutefois, dans ce travail, je me suis contentée des aspects physiologiques de la symbiose. Restent à explorer les volets génétique, qui seul a une réelle portée évolutive, et écologique, qui inclura les facteurs environnementaux éliminés des expériences. Finalement, mon travail pose plus de questions qu'il n'en résout : le compromis survie-reproduction a-t-il une base génétique ? Si oui, quelle est la forme de la courbe de compensation entre ces traits ? Les stratégies rencontrées dans la nature valident-elles les prédictions théoriques ? Quels sont les paramètres influençant la répartition des espèces sur le terrain ? En particulier, quel rôle jouent les compétitions entre couples némato-bactériens sur les modalités d'association ? Pourraient-elles expliquer les différences de spécificité entre couples ?

## **Perspectives...**

### **...écologiques**

Une méta-analyse sur la répartition des différents couples némato-bactériens dans le monde, superposée à leurs traits d'histoire de vie, serait probablement très informative. Elle permettrait de savoir quels sont les facteurs-clés dans la distribution des espèces de nématodes : l'étendue de leur spectre d'hôtes ? L'étendue de leur spectre de symbiotes ? Mais aussi : leur compétitivité ? Leur persistance dans le sol ? Leur virulence envers l'insecte ? Ces questions peuvent aussi être abordées individuellement par expérimentations de terrain à plus petite échelle.

### **...expérimentales**

L'évolution expérimentale est un moyen direct d'étudier les corrélations génétiques entre traits. Compte tenu des résultats précédents, l'objectif à moyen terme est de tester si les corrélations entre rétention et réussite parasitaire d'une part, entre rétention et mortalité de l'autre, sont retrouvées entre génotypes différents de nématodes. Pour ce faire, il nous faut obtenir, par infestations successives d'insectes, des lignées de nématodes qu'on espère divergentes au bout de quelques générations, et les comparer entre elles et avec les nématodes ancestraux sur les traits d'histoire de vie habituels (rétention, survie, reproduction). La mesure de ces traits sur plusieurs générations nous renseignera sur leur déterminisme génétique.

Des expériences de sélection artificielle sont également envisagées, qui permettraient une manipulation plus directe et contrôlée des coûts et bénéfices de l'association. Par exemple, en sélectionnant des nématodes qui survivent bien, on s'attendrait à voir la rétention et la reproduction diminuer. Dans un premier temps, ces expériences de sélection seront menées sur le

partenaire bactérien, plus aisé à manipuler. En sélectionnant sur la vitesse de multiplication des bactéries puis en réassociant les lignées sélectionnées avec des nématodes, on accèdera à l'effet du taux de croissance de la bactérie sur les coûts et bénéfices de l'association pour le nématode. Des bactéries qui se multiplient rapidement confèrent-elles un avantage supplémentaire au nématode (mort précoce de l'insecte, avantage compétitif face aux souches bactériennes ancestrales) en phase parasitaire ? Sont-elles plus coûteuses à transporter en phase libre ?

Il serait aussi intéressant de manipuler le coût à l'association chez *S. carpocapsae* pour savoir si la proportion d'individus aposymbiotiques peut varier en réponse à ce coût. Dans la nature, elle dépend vraisemblablement de nombreux autres paramètres comme l'abondance relative des insectes et des nématodes dans le sol, les capacités de dispersion des stades infestants et la présence d'autres parasites d'insectes.

### **...théoriques**

Cette approche repose sur le pré-supposé d'un déterminisme génétique des traits étudiés. C'est une hypothèse forte, mais qui ouvre la voie à des questions pour le moment difficiles à aborder d'un point de vue expérimental. Par exemple, quel est l'effet des traits de la symbiose, et notamment de la forme de la courbe de compensation survie-reproduction, sur les stratégies fixées à l'équilibre ? Sous quelle(s) condition(s) la spécificité dans ces associations est-elle favorisée ? En s'inspirant du modèle classique Susceptible-Infesté, on peut envisager l'étude d'un système à trois compartiments : les insectes sains, les insectes infestés et les nématodes libres. En utilisant les principes de la dynamique adaptative, nous aurons accès aux conditions qui permettent à un nématode mutant sur un trait-clé d'envahir une population résidente à l'équilibre.

# **Bibliographie**

# Bibliographie

- J. F. Addicott. Cheaters in Yucca/Moth Mutualism. *Nature*, 380 :114–115, 1996.
- J. F. Addicott and R. A. Tyre. Cheating in an obligate mutualism : How often do yucca moths benefit yuccas ? *Oikos*, 72 :382–394, 1995.
- B. J. Akerley, P. A. Cotter, and J. F. Miller. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell*, 80 :611–620, 1995.
- R. J. Akhurst. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes, *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.*, 121 :303–309, 1980.
- R. J. Akhurst. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Microbiol.*, 128 :3061–3065, 1982.
- R. J. Akhurst. *Neoplectana* species : specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. *Exp. Parasitol.*, 55 :258–263, 1983.
- R. J. Akhurst. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii* : its interaction with insect pathogenic nematodes. *Syst. Appl. Microbiol.*, 8 :142–147, 1986.
- R. J. Akhurst and N. Boemare. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *J. Gen. Microbiol.*, 134 :1835–1845, 1988.
- J. Banerjee, J. Singh, M. C. Joshi, S. Ghosh, and N. Banerjee. The Cytotoxic Fimbrial Structural Subunit of *Xenorhabdus nematophila* Is a Pore-Forming Toxin. *J. Bacteriol.*, 188 :7957–7962, 2006.
- M. E. Baur and H. K. Kaya. *Population of Entomopathogenic Nematodes in Foodweb*, chapter 11 : Persistence of Entomopathogenic Nematodes, pages 225–240. CABI Publishing, UK-USA, 2001.
- H. P. J. Bennett and D. J. Clarke. The *pbgPE* operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *J. Bacteriol.*, 187(1) :77–84, 2005.

- K. C. Binnington and L. Brooks. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*, chapter 17 : Fimbrial attachment of *Xenorhabdus nematophilus* to the intestine of *Steinernema carpocapsae*, pages 147–155. Melbourne, Australia : CSIRO Publications, 1993.
- S. B. Bintrim and J. C. Ensign. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. *J. Bacteriol.*, 180(5) :1261–1269, 1998.
- A. F. Bird and R. Akhurst. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int. J. Parasitol.*, 13 :599–606, 1983.
- E. Björkman. Mycorrhiza in pine and spruce seedlings grown under varied radiation intensities in rich soils with or without nitrate added. *Medd. Stat. Skogsförs. Anst.*, 32 :23–74, 1940.
- M. L. Blaxter, P. de Ley, J. R. Garey, L. X. Liu, P. Scheldeman, A. Vierstraete, J. R. Vanfleteren, L. Y. Mackey, M. Dorris, L. M. Frisse, J. T. Vida, and W. Kelley Thomas. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392 :71–75, 1998.
- N. Boemare. *Entomopathogenic nematology*, chapter 2 : Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, pages 35–56. CAB International, 2002.
- N. Boemare, A. Givaudan, M. Brehélin, and C. Laumond. Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. *Symbiosis*, 22 :21–45, 1997.
- N. E. Boemare, R. J. Akhurst, and R. G. Mourant. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43 :249–255, 1993.
- D. A. Bohan. Spatial structuring and frequency distribution of the nematode *Steinernema feltiae* Filipjev. *Parasitology*, 121 :417–425, 2000.
- D. A. Bohan and W. M. Hominick. Investigations on the presence of an infectious proportion amongst populations of *Steinernema feltiae* (site 76 strain) infective stages. *Parasitology*, 112 :113–118, 1996.
- M. Brehélin, L. Drif, L. Baud, and N. Boemare. Insect hemolymph - cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 19 :301–307, 1989.
- M. F. Brivio, M. Moro, and M. Mastore. Down-regulation of antibacterial peptide synthesis in an insect model induced by the body-surface of an entomoparasite (*Steinernema feltiae*). *Dev Comp Immunol*, 30 :627–638, 2006.
- J. L. Bronstein. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol. Evol.*, 9(6) : 214–217, 1994.



- J. L. Bronstein. *Mosaic Landscapes and Ecological Processes.*, chapter The plant/pollinator landscape, pages 256–288. Chapman and Hall, New York, 1995.
- K. Brugirard-Ricaud, E. Duchaud, A. Givaudan, P. A. Girard, F. Kunst, N. Boemare, M. Brehélin, and R. Zumbihl. Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol.*, 7(3) :363–371, 2005.
- J. F. Campbell, E. Lewis, F. Yoder, and R. Gaugler. Entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turfgrass. *Biol. Control*, 5 :598–606, 1995.
- J. F. Campbell, A. M. Koppenhöfer, H. K. Kaya, and B. Chinnasri. Are there temporarily non-infectious dauer stages in entomopathogenic nematode populations : a test of the phased infectivity hypothesis. *Parasitology*, 118 :499–508, 1999.
- J. F. Campbell, E. E. Lewis, S. P. Stock, S. Nadler, and H. K. Kaya. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.*, 35(2) :142–145, 2003.
- H. Chandra, P. Khandelwal, A. Khattri, and N. Banerjee. Type 1 fimbriae of insecticidal bacterium *Xenorhabdus nematophila* is necessary for growth and colonization of its symbiotic host nematode *Steinernema carpocapsae*. *Env. Microbiol.*, 10(5) :1285–1295, 2008.
- E. L. Charnov. Optimal foraging, the Marginal Value Theorem. *Theor. Popul. Biol.*, 9(2) : 129–136, 1976.
- E. L. Charnov. Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. *Proc.Nat. Ac. Sci.*, 76 : 2480–2484, 1979.
- E. L. Charnov, J. Maynard-Smith, and J. J. Bull. Why be an hermaphrodite? *Nature*, 263 : 125–126, 1976.
- C. Combes. *Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme.* Collection Ecologie n°26, 1995.
- C. Combes. *Parasitism. The Ecology and Evolution of Intimate Interactions.* The University of Chicago Press, 2001.
- C. E. Cowles and G. Goodrich-Blair. Characterization of a lipoprotein, NilC, required by *Xenorhabdus nematophila* for mutualism with its nematode host. *Mol. Microbiol.*, 54(2) :464–477, 2004.
- C. E. Cowles and H. Goodrich-Blair. The *Xenorhabdus nematophila* nilABC genes confer the ability of *Xenorhabdus* spp. to colonize *Steinernema carpocapsae* nematodes. *J. Bacteriol.*, 190(12) :4121–4128, 2008.

- K. N. Cowles, C. E. Cowles, C. R. Richards, E. C. Martens, and H. Goodrich-Blair. The global regulator Lrp contributes to mutualism, pathogenesis and phenotypic variation in the bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Cell. Microbiol.*, 9(5) :1311–1323, 2007.
- S. R. X. Dall, I. C. Cuthill, N. Cook, and M. Morphet. Learning about food : starlings, Skinner Boxes and earth-worms. *J. Exp. Anal. Behav.*, 37 :181–192, 1997.
- C. R. Darwin. *L'origine des espèces*. Garnier Flammarion, Paris, 1859.
- P. de Laguérie, I. Olivieri, and P. H. Gouyon. Environmental effects on fitness-sets shape and Evolutionarily Stable Strategies. *J.Theor. Biol.*, 163 :113–125, 1993.
- R. A. de Maagd, W. C. Yang, L. G. D. Roo, I. H. M. Mulders, H. P. Roest, H. P. Spaank, T. Bisseling, and L. J. J. Lugtenberg. Down-regulation of expression of the *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein gene ropA occurs abruptly in interzone II-III of pea nodules and can be uncoupled from nif gene activation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7(2) :276–281, 1994.
- C. de Mazancourt, M. Loreau, and U. Dieckmann. Understanding mutualisms when there is adaptation to the partner. *J. Ecol.*, 93 :305–314, 2005.
- M. de Paepe and F. Taddei. Viruses' life history : Towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS Biology*, 4(7) :e193–e193, 2006.
- S. Derzelle, E. Turlin, E. Duchaud, S. Pages, F. Kunst, A. Givaudan, and A. Danchin. The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects. *J. Bacteriol.*, 186(5) :1270–1279, 2004.
- H. R. Deyoe, J. C. Marks, and R. L. Lowe. The effect of nitrogen and phosphorus on the endosymbiont load of *Rhopalodia gibba* and *Epithemia turgida* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 28(6) :773–777, 1992.
- M. A. Djordjevic, D. W. Gabriel, and B. G. Rolfe. *Rhizobium*– The refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25 :145–168, 1987.
- M. E. Dorken and E. T. A. Mitchard. Phenotypic plasticity of hermaphrodite sex allocation promotes the evolution of separate sexes : An experimental test of the sex-differential plasticity hypothesis using *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *Evolution*, 62(4) :971–978, 2008.
- A. E. Douglas. Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity*, 81 : 599–603, 1998.
- A. E. Douglas. Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytol.*, 177(4) :849–858, 2008.
- M. J. Downes and C. T. Griffin. Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 6 : 347–356, 1996.

- J. A. Downie. Signalling strategies for nodulation of legumes by *Rhizobia*. *Trends Microbiol.*, 2 :318–324, 1994.
- G. Dunphy, C. Miyamoto, and E. Meighen. A homoserine lactone autoinducer regulates virulence of an insect-pathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *J. Bacteriol.*, 179 :5288–5291, 1997.
- G. B. Dunphy, T. A. Rutheford, and J. M. Webster. Growth and virulence of *Steinernema glaseri* influenced by different subspecies of *Xenorhabdus nematophilus*. *J. Nematol.*, 17(4) : 476–482, 1985.
- V. Emelianoff, M. Sicard, N. Le Brun, C. Moulia, and J. B. Ferdy. Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. *Parasitol. Res.*, 100(3) :657–659, 2007.
- V. Emelianoff, E. Chapuis, N. Le Brun, M. Chiral, C. Moulia, and J.-B. Ferdy. A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. *Evolution*, 62(4) :932–942, 2008.
- J. P. Fairbairn, A. Fenton, R. A. Norman, and P. J. Hudson. Re-assessing the infection strategies of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditidae, Steinernematidae). *Parasitology*, 121 :211–216, 2000.
- X. Fan and W. M. Hominick. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda : Steinernematidae). *Rev. Nematol.*, 14 :407–412, 1991.
- A. Fenton and P. J. Hudson. Optimal infection strategies : should macroparasites hedge their bets? *Oikos*, 96 :92–101, 2002.
- R. Ferrière, J. L. Bronstein, S. Rinaldi, R. Law, and M. Gauduchon. Cheating and the evolutionary stability of mutualisms. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 269(1493) :773–780, 2002.
- R. Ferrière, M. Gauduchon, and J. L. Bronstein. Evolution and persistence of obligate mutualists and exploiters : competition for partners and evolutionary immunization. *Ecol. Lett.*, 10(2) : 115–126, 2007.
- Y. Flores-Lara, D. Rennekar, S. Forst, H. Goodrich-Blair, and P. Stock. Influence of nematode age and culture conditions on morphological and physiological parameters in the bacterial vesicle of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda : Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 95 (2) :110–118, 2007.
- S. A. Frank. Host-symbiont conflict over the mixing of symbiotic lineages. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 263 :339–344, 1996.
- O. Froy. Convergent evolution of invertebrate defensins and nematode antibacterial factors. *Trends Microbiol.*, 13(7) :314–319, 2005.

- M. Goetsch, H. Owen, B. Goldman, and S. Forst. Analysis of the PixA inclusion body protein of *Xenorhabdus nematophila*. *J. Bacteriol.*, 188(7) :2706–2710, 2006.
- P. Goetz, A. Boman, and H. G. Boman. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 212 :333–350, 1981.
- H. Goodrich-Blair and D. J. Clarke. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photobacterium* : two roads to the same destination. *Mol. Microbiol.*, 64(2) :260–268, 2007.
- S. J. Gould. A developmental constraint in *Cerion*, with comments on the definition and interpretation of constraints in evolution. *Evolution*, 43(3) :516–539, 1989.
- P. S. Grewal, E. E. Lewis, and R. Gaugler. Response of infective stage parasites (Nematoda : Steinernematidae) to volatile cues from infected hosts. *J. Chem. Ecol.*, 23(2) :503–515, 1997.
- C. T. Griffin, M. J. Downes, and W. Block. Tests of antarctic soils for insect parasitic nematodes. *Antarctic Sci.*, 2 :221–222, 1990.
- J. S. Gunn, W. J. Belden, and S. I. Miller. Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb. Pathog.*, 25(2) :77–90, 1998.
- E. Hacskeylo. Mycorrhiza : the ultimate in reciprocal parasitism ? *Bioscience*, 22(10) :577–583, 1972.
- R. Han and R.-U. Ehlers. Trans-specific nematocidal activity of *Photobacterium luminescens*. *Nematology*, 1 :687–693, 1999.
- R. C. Han and R. U. Ehlers. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *J. Invertebr. Pathol.*, 75(1) :55–58, 2000.
- L. D. Harder and S. C. H. Barrett. The energy cost of bee pollination for *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Funct. Ecol.*, 6 :226–233, 1992.
- U. Hentschel, M. Steinert, and J. Hacker. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 8(5) :226–231, 2000.
- E. E. Herbert and H. Goodrich-Blair. Friend and Foe : The Two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 :634–646, 2007.
- K. Heungens, C. E. Cowles, and H. Goodrich-Blair. Identification of *Xenorhabdus nematophila* genes required for mutualistic colonization of *Steinernema carpocapsae* nematodes. *Mol. Microbiol.*, 45(5) :1337–1353, 2002.

- J. D. Hoeksema and E. M. Bruna. Pursuing the big questions about interspecific mutualism : a review of theoretical approaches. *Oecologia*, 125 :321–330, 2000.
- S. K. Hoiseth and B. A. D. Stocker. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 291 :238–239, 1981.
- W. M. Hominick. *Entomopathogenic nematology*, chapter Biogeography, pages 115–143. CABI Publishing, Wallingford, UK., 2002.
- W. M. Hominick, B. R. Briscoe, F. G. Del Pino, J. Heng, D. J. Hunt, Z. Mráček, K. Nguyen, A. P. Reid, S. Spiridinov, S. Stock, D. Sturhan, C. Waturu, and M. Yoshida. Biosystematics of entomopathogenic nematodes : current status, protocols and definitions. *J. Helminthol.*, 71 : 271–298, 1997.
- J. P. Hoover and S. K. Robinson. Retaliatory mafia behavior by a parasitic cowbird favors host acceptance of parasitic eggs. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 104(11) :4479–4483, 2007.
- K. J. Hu, J. X. Li, and J. M. Webster. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 1(5) :457–469, 1999.
- S. Q. Huang, S. G. Sun, Y. Takahashi, and Y. H. Guo. Gender variation of sequential inflorescences in a monoecious plant *Sagittaria trifolia* (Alismataceae). *Ann. Bot. (Lond.)*, 90(5) : 613–622, 2002.
- S. Humphreys, A. Stevenson, A. Bacon, A. B. Weinhardt, and M. Roberts. The alternative sigma factor,  $\sigma^E$ , is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 67 :1560–1568, 1999.
- M. S. Jacobs and M. J. Wade. A synthetic review of the theory of gynodioecy. *Am. Nat.*, 161 (6) :837–851, 2003.
- J. Jaenike. Host specialization in phytophagous insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 21 :243–273, 1990.
- D. H. Janzen. How to be a fig. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 10 :13–51, 1979.
- D. H. Janzen. *The biology of mutualism*, chapter The natural history of mutualisms, pages 40–99. Oxford University Press, Oxford., 1985.
- D. Ji and Y. Kim. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 50(6) :489–496, 2004.
- N. C. Johnson, J. H. Graham, and F. A. Smith. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.*, 135 :575–586, 1997.

- R. A. Johnstone and R. Bshary. Mutualism, market effects and partner control. *J. Evol. Biol.*, 21(3) :879–888, 2008.
- S. A. Joyce and D. J. Clarke. A hexA homologue from *Photorhabdus* regulates pathogenicity, symbiosis and phenotypic variation. *Mol. Microbiol.*, 47(5) :1445–1457, 2003.
- S. A. Joyce, R. J. Watson, and D. J. Clarke. The regulation of pathogenicity and mutualism in *Photorhabdus*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(2) :127–132, 2006.
- P. Khandelwal, D. Choudury, A. Birah, M. K. Reddy, G. P. Gupta, and N. Banerjee. Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. *J. Bacteriol.*, 186(19) : 6465–6476, 2004.
- E. T. Kiers, R. A. Rousseau, S. A. West, and R. Ford Denison. Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature*, 425 :78–81, 2003.
- E. T. Kiers, R. A. Rousseau, and R. F. Denison. Measured sanctions : legume hosts detect quantitative variation in rhizobium cooperation and punish accordingly. *Evol. Ecol. Res.*, 8 (6) :1077–1086, 2006.
- D. Kim and S. Forst. *Xenorhabdus nematophila* : mutualist and pathogen. *ASM News*, 71(4) : 174–178, 2005.
- Y. Kim, D. Ji, S. Cho, and Y. Park. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A(2) to induce host immunodepression. *J. Invertebr. Pathol.*, 89(3) :258–264, 2005.
- A. M. Koppenhoefer and E. M. Fuzy. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Invertebr. Pathol.*, 92 :11–22, 2003.
- A. M. Koppenhöfer, H. K. Kaya, S. Shanmugam, and G. L. Wood. Interspecific competition between Steinernematid nematodes within an insect host. *J. Invertebr. Pathol.*, 66 :99–103, 1995.
- A. M. Koppenhofer, M. E. Baur, and H. K. Kaya. Competition between Two Steinernematid Nematode Species for an Insect Host at Different Soil Depths. *J. Parasitol.*, 82(1) :34–40, 1996.
- P. X. Kover and K. Clay. Trade-off between virulence and vertical transmission and the maintenance of a virulent plant pathogen. *Am. Nat.*, 152(2), 1998.
- E. Krin, N. Chakroun, E. Turlin, A. Givaudan, F. Gaboriau, I. Bonne, J. C. Rousselle, L. Frangeul, C. Lacroix, M. F. Hullo, L. Marisa, A. Danchin, and S. Derzelle. Pleiotropic role of quorum-sensing autoinducer 2 in *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (10) :6439–6451, 2006.

- S. P. Kung, R. Gaugler, and H. K. Kaya. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *J. Invertebr. Pathol.*, 55(3) :401–406, 1990.
- C. Laumond, H. Mauléon, and A. Kermarrec. Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nématode entomophage *Neoplectana carpocapsae*. *Entomophaga*, 24 :13–27, 1979.
- M. D. Lavine and M. R. Strand. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10) :1295–1309, 2002.
- J. R. Leake. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.*, 127 : 171–216, 1994.
- E. E. Lewis, R. Gaugler, and R. Harrison. Entomopathogenic nematode host finding : response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105 :309–315, 1992.
- S. R. Long and B. J. Staskawicz. Prokaryotic plant parasites. *Cell*, 73 :921–935, 1993.
- C. Marie, W. J. Broughton, and W. J. Deakin. *Rhizobium* type III secretion systems : legume charmers or alarmers ? *Curr. Opin. Plant Biol.*, pages 336–342, 2001.
- E. C. Martens and H. Goodrich-Blair. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cell Microbiol.*, 7(12) :1723–1735, 2005.
- E. C. Martens, K. Heungens, and H. Goodrich-Blair. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *J. Bacteriol.*, 185 :3147–3154, 2003.
- K. Mathee, O. Ciofu, C. Sternberg, P. W. Lindum, J. I. A. Campbell, P. Jensen, A. Johnsen, M. Givskov, D. Ohman, S. Molin, N. Hiby, and A. Kharazmi. Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide : a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, 145 :1349–1357, 1999.
- M. J. Mc Fall-Ngai. The development of cooperative associations between animals and bacteria : establishing détente among domains. *Am. Zool.*, 38 :593–608, 1998.
- B. V. Mc Inerney, R. P. Gregson, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, G. R. Lyons, S. H. Rhodes, D. R. J. Smith, L. M. Engelhardt, and A. H. White. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. *J. Nat. Prod.*, 54(3) :774–784, 1991.
- D. K. Mitani, H. K. Kaya, and H. Goodrich-Blair. Comparative study of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, reared on mutant and wild-type *Xenorhabdus nematophila*. *Biol. Control*, 29 :382–391, 2004.

- J. A. Morgan, V. Kuntzelmann, S. Taverno, M. A. Ousley, and C. Winstanley. Survival of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* in water and soil. *J. Appl. Microbiol.*, 83 :665–670, 1997.
- N. Moureaux, T. Karjalainen, A. Givaudan, P. Bourlioux, and N. Boemare. Biochemical characterization and agglutinating properties of *Xenorhabdus nematophilus* F1 fimbriae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(7) :2707–2712, 1995.
- Z. Mráček, K. B. Nguyen, P. Tailliez, N. Boemare, and S. Chen. *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a novel species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts, China. *J. Invertebr. Pathol.*, 93 :157–169, 2006.
- D. N. Munns. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil*, 24(1) :33–47, 1968.
- P. Nardon, A. M. Grenier, and A. Heddi. Endocytobiont control by the host in the weevil *Sitophilus oryzae*, Coleoptera, Curculionidae. *Symbiosis*, 25 :237–250, 1998.
- S. V. Nyholm and J. M. Mc Fall-Ngai. Dominance of *Vibrio fischeri* in secreted mucus outside the light organ of *Euprymna scolopes* : the first site of specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 :3932–3937, 2003.
- D. M. O' Halloran. An investigation of chemotaxis in the insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology*, 127(4) :375–385, 2003.
- J. Offenberg. Balancing between mutualism and exploitation : the symbiotic interaction between *Lasius* ants and aphids. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49(4) :304–310, 2001.
- D. Park and S. Forst. Co-regulation of motility, exoenzyme and antibiotic production by the EnvZ-OmpR-FlhDC-FliA pathway in *Xenorhabdus nematophila*. *Mol. Microbiol.*, 61(6) : 1397–1412, 2006.
- Y. Park, E. E. Herbert, C. E. Cowles, K. N. Cowles, M. N. Menard, S. S. Orchard, and H. Goodrich-Blair. Clonal variation in *Xenorhabdus nematophila* virulence and suppression of *Manduca sexta* immunity. *Cell Microbiol.*, 9(3) :645–656, 2007.
- V. J. Paul, S. Frautschy, W. Fenical, and K. H. Neilson. Antibiotics in microbial ecology - Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *J. Chem. Ecol.*, 7(3) :589–597, 1981.
- O. Pellmyr and C. J. Huth. Evolutionary stability of mutualism between yuccas and yucca moths. *Nature*, 372 :257–260, 1994.
- S. Peng, D. M. Eissenstat, J. H. Graham, K. Williams, and N. C. Hodge. Growth depression in mycorrhizal *Citrus* at high-phosphorus supply. *Plant. Physiol.*, 101 :1063–1071, 1993.



- Y. Q. Peng, Z. B. Duan, D. R. Yang, and J. Y. Rasplus. Co-occurrence of two *Eupristina* species on *Ficus altissima* in Xishuangbanna, SW China. *Symbiosis*, 45(1-3) :9–14, 2008.
- G. O. Poinar. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoplectana* sp. (Steinernematidae : Nematoda). *Nematologica*, 12 :105–108, 1966.
- G. O. Poinar. *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1979.
- G. O. Poinar and R. Leutenegger. Anatomy of the infective and normal third-stage juveniles of *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae : Nematoda). *J. Parasitol.*, 54(2) : 340–350, 1968.
- G. O. Poinar and G. M. Thomas. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) in the development of nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitology*, 56 :385–390, 1966.
- J. Poinar, G. O. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida ; Heterorhabditidae n. Fam.). *Nematologica*, 21 : 463–470, 1976.
- F. Ponton, D. G. Biron, J. Moore, A. P. Moller, and F. Thomas. Facultative virulence : A strategy to manipulate host behaviour ? *Behav. Process.*, 72(1) :1–5, 2006.
- I. Popiel, D. L. Grove, and M. J. Friedman. Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. *Parasitology*, 99 :77–81, 1989.
- S. Rasmann, T. G. Köllner, J. Degenhardt, I. Hiltbold, S. Toepfer, U. Kuhlmann, J. Gershenzon, and T. C. J. Turlings. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434 :732–737, 2005.
- C. Ratledge and L. G. Dover. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54 :881–941, 2000.
- V. Ravigné. *Etude théorique des évolutions conjointes de traits. Les exemples de la spécialisation écologique et de la dispersion chez les plantes*. PhD thesis, Montpellier II, 2003.
- C. Ribeiro and M. Brehélin. Insect haemocytes : What type of cell is that ? *J. Insect Physiol.*, 52(5) :417–429, 2006.
- J. Rincones, H. Mauléon, and K. Jaffe. Bacteria modulate the degree of amphimix of their symbiotic entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* sp.) in response to nutritional stress. *Naturwissenschaften*, 88 :310–312, 2001.
- C. G. Riveros, M. E. Doucet, M. A. Bertolotti, and J. A. Di Rienzo. Infection rate of different generations of infective juveniles (IJs) of *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamiya, 1988

- (Steinernematidae ; Rhabditidae) from the province of Córdoba, Argentina. *Nematology*, 9 (6) :903–905, 2007.
- R. Rosengren and L. Sundström. *Ant-plant interactions*, chapter The interaction between red wood ants, *Cinara* aphids and pines : a ghost of mutualism past ?, pages 80–91. Oxford University Press, New York., 1991.
- R. Rowan, N. Knowlton, A. Baker, and J. Jara. Landscape ecology of algal symbionts creates variations in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388 :265–269, 1997.
- M. T. Rutter and M. D. Rausher. Natural selection on extrafloral nectar production in *Chamaecrista fasciculata* : The costs and benefits of a mutualism trait. *Evolution*, 58(12) :2657–2668, 2004.
- J. J. Ryder and C. T. Griffin. Phased infectivity in *Heterorhabditis megidis* : the effects of infection density in the parental host and filial generation. *Int. J. Parasitol.*, 33 :1013–1018, 2003.
- H. Y. Samaliev, F. I. Andreoglou, S. A. Helawad, N. G. M. Hague, and S. R. Gowen. The nematocidal effects of the bacteria *Pseudomonas oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 2(5), 2000.
- E. San-Blas, S. R. Gowen, and B. Pembroke. Scavenging or infection ? Possible host choosing by entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 10 :251–259, 2008.
- I. R. Sanders. Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends Plant Sci.*, 8(4) :143–145, 2003.
- P. J. A. Shaw and K. Lankey. Studies on the Scots pine mycorrhizal fruitbody succession. *Mycologist*, 8 :172–175, 1994.
- M. Sicard. *Modalités écologiques et évolutives des interactions entre les nématodes entomopathogènes Steinernema et leurs symbiotes bactériens Xenorhabdus*. PhD thesis, Université Montpellier 2, 2003.
- M. Sicard, N. Le Brun, S. Pagès, B. Godelle, N. Boemare, and C. Moulia. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts : contrasting types of interaction. *Parasitol. Res.*, 91 :520–524, 2003.
- M. Sicard, K. Brugirard-Ricaud, S. Pagès, A. Lanois, N. Boemare, M. Brehélin, and A. Givaudan. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 :6473–6480, 2004a.
- M. Sicard, J. B. Ferdy, S. Pagès, N. Le Brun, B. Godelle, N. Boemare, and C. Moulia. When mutualists are pathogens : an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J. Evol. Biol.*, 17 :985–993, 2004b.

- M. Sicard, H. Ramone, N. Le Brun, S. Pagès, and C. Moulia. Specialization of the entomopathogenic nematode *Steinernema* with its mutualistic *Xenorhabdus* symbionts. *Naturwissenschaften*, 92(10) :472–476, 2005.
- M. Sicard, J. Hinsinger, N. Le Brun, S. Pagès, N. Boemare, and C. Moulia. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes (*Steinernema*) is modified by their bacterial symbionts (*Xenorhabdus*). *BMC Evol. Biol.*, 6(68), 2006.
- M. Sicard, S. Hering, R. Schulte, S. Gaudriault, and H. Schulenburg. The effect of *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda : Rhabditidae). *Env. Microbiol.*, 9(1) :12–25, 2007.
- N. Simoes. Virulence factors produced by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* during parasitism. In *Proceedings of the VIth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Montpellier, France, August 28 - September 2, 1994*, pages 116–119.
- D. C. Smith. The symbiotic condition. *Symbiosis*, 14 :3–15, 1992.
- J. Soberon and C. Martinez. *The biology of mutualism.*, chapter Cheating and taking advantage in mutualistic associations, pages 192–216. London : Croom Helm, 1985.
- S. C. Stearns. *Patterns and processes in the History of Life.*, chapter Natural selection and fitness, adaptation and constraint, pages 23–44. Springer-Verlag, N. Y., 1986.
- G. Steiner. *Aplectana kraussei* n. sp., einer in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen Nematoden. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung*, 59 :14–18, 1923.
- M. Sugawara, S. Okazaki, N. Nukui, H. Ezura, H. Mitsui, and K. Minamizawa. Rhizobitoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnol. Adv.*, 24(4) :382–388, 2006.
- J. Tabart. Variabilité intra-spécifique des bactériocines queue de phage au sein de l'espèce *Xenorhabdus nematophila* et implications écologiques. Master's thesis, DEA de Parasitologie, Université Montpellier 2, 2003.
- J. O. Thaler, S. Baghdiguan, and N. Boemare. Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 :2049–2052, 1995.
- J. M. Tinbergen. Foraging decisions in starlings (*Sturnus vulgaris* L.). *Ardea*, 69 :1–67, 1981.
- P. Torr, S. Heritage, and M. J. Wilson. Vibration as a novel signal for host location by parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.*, 34 :997–999, 2004.

- P. van Rhijn and J. Vanderleyden. The *Rhizobium*–plant symbiosis. *Microbiol. Rev.*, 59 :124–142, 1995.
- F. Vigneux, R. Zumbihl, G. Jubelin, C. Ribeiro, J. Poncet, S. Baghdiguian, A. Givaudan, and M. Brehélin. The xaxAB genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. *J. Biol. Chem.*, 282 (13) :9571–9580, 2007.
- K. L. Visick. Layers of signalling in a Bacterium-Host association. *J. Bacteriol.*, 187(11) : 3603–3606, 2005.
- K. L. Visick and E. G. Ruby. *Vibrio fischeri* and its host : it takes two to tango. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9 :623–638, 2006.
- E. I. Vivas and H. Goodrich-Blair. *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host-bacterium interactions : *rpoS* is necessary for mutualism with nematodes. *J. Bacteriol.*, 183(16) :4687–4693, 2001.
- Y. I. Wang and R. Gaugler. *Steinernema glaseri* surface coat protein suppresses the immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera : Scarabaeidae) larvae. *Biol. Control*, 14(1) :45–50, 1999.
- R. J. Watson and S. A. Joyce. The *exbD* gene of *Photorhabdus temperata* is required for full virulence in insects and symbiosis with the nematode *Heterorhabditis*. *Mol. Microbiol.*, 56 (3) :763–773, 2005.
- J. M. Webster, G. Chen, and J. Li. Parasitic worms : an ally in the war against the superbugs. *Parasitol. Today*, 14(4) :161–163, 1998.
- A. M. Weeks, M. Turelli, W. R. Harcombe, K. Tracy Reynolds, and A. A. Hoffman. From parasite to mutualist : rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*, 5(5) :e114–e114, 2007.
- R. J. Yates, J. G. Howieson, W. G. Reeve, L. Brau, J. Speijers, K. Nandasena, D. Real, E. Sezmis, and G. W. O’hara. Host-strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, 3 : 822–833, 2008.

## Les problèmes de couple dans les symbioses nématode-bactériennes parasites d'insecte.

**Résumé :** Les nématodes entomopathogènes *Steinernema* sont associés symbiotiquement à des bactéries du genre *Xenorhabdus*. Leur cycle de vie comprend deux phases : une phase libre, dans le sol, où les nématodes portent leurs symbiotes dans le tube digestif, et une phase parasite, dans l'insecte, où les deux partenaires se multiplient côte à côte. Le bilan fin de l'interaction, globalement bénéfique pour les deux partenaires, a été peu étudié pour le moment.

Dans un premier temps, nous avons abordé ces symbioses d'un point de vue coûts-bénéfices pour le nématode afin d'identifier les pressions de sélection agissant sur son **investissement dans la symbiose**. Nous montrons que l'association est à la fois bénéfique (reproduction en phase parasitaire) et coûteuse (mortalité en phase libre) pour le nématode, en proportion de sa charge symbiotique. Ces corrélations engendrent un compromis survie-reproduction pour le nématode, médié par ses symbiotes. Selon les conditions environnementales, elles pourraient éventuellement déstabiliser l'association, et, notamment, altérer sa spécificité.

Dans un second temps, nous avons donc exploré la **spécificité** de ces associations dans la nature et au laboratoire. Lors d'un échantillonnage de terrain, nous avons retrouvé la spécificité de ces associations largement décrite par ailleurs. Au laboratoire, la réassociation expérimentale entre nématodes et bactéries non natives montre que le spectre des bactéries retenues est plus étroit que le spectre des bactéries bénéfiques. De plus, des différences de modalités d'association apparaissent entre espèces de nématodes, qui suggèrent que la correspondance nématode - bactérie ne serait pas aussi stricte que prévu.

**Mots-clés :** symbiose, mutualisme, coût, compromis, investissement, spécificité, *Steinernema*, *Xenorhabdus*.

### Relationship problems in entomopathogenic nematode-bacteria couples.

**Abstract :** Entomopathogenic nematodes from *Steinernema* genus are symbiotically associated with *Xenorhabdus* bacteria. Their life cycle comprises two phases : a free stage in the soil, where bacteria are carried inside nematodes' gut and a parasitic stage in the insect, where both partners are separated and multiply in parallel. For nematodes, benefits are clear during the parasitic stage while costs prevail during the free stage.

We first tried to measure the balance between costs and benefits in these symbioses to identify selective pressures acting on nematode's **symbiotic investment**. We showed that nematodes endure costs to the association in free stage in terms of survival, these costs increasing with bacterial load. On the other side, nematodes benefit from the symbiosis in proportion of bacterial load in parasitic stage in terms of reproduction. These two antagonistic effects lead to a trade-off between nematodes' survival and reproduction which is mediated by their bacterial symbionts. Thus, depending on the environment, these correlations could challenge association stability. It could also impact the way the specificity of these associations evolves.

In a second part, we addressed the question of **symbiosis specificity** *in natura* as well as in laboratory. Field samples confirmed the already-known constancy of association between a nematode species and a bacteria species all over the world. Experimental re-associations between two nematode species and foreign bacteria showed differences between retention and benefit specificities as well as inter-specific variability. Thus the one-to-one association between nematode and bacteria species may not be as strict as previously thought.

**Keywords :** symbiosis, mutualism, cost, trade-off, investment, specificity, *Steinernema*, *Xenorhabdus*.