HAL
open science

Diversité et impact des Wolbachia féminisantes sur la structuration génétique d'Armadillidium vulgare

S. Verne

To cite this version:

S. Verne. Diversité et impact des Wolbachia féminisantes sur la structuration génétique d'Armadillidium vulgare. Ecologie, Environnement. Université de Poitiers, 2007. Français. NNT : . tel-00181052

HAL Id: tel-00181052

https://theses.hal.science/tel-00181052

Submitted on 23 Oct 2007

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 de Poitiers
Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

Ecole Doctorale Ingénierie Chimique, Biologique et Géologique

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Poitiers

(Diplôme National – Arrêté du 25 avril 2002)

Spécialité : Génétique des populations

Présentée par

Sébastien Verne

Diversité et impact des *Wolbachia* féminisantes sur la structuration génétique d'*Armadillidium vulgare*

Directeur de thèse : Frédéric Grandjean

Co-directrice de thèse : Monique Johnson

Soutenue le 20 septembre 2007

devant la commission d'examen

JURY

J. SHYKOFF	Directrice de recherche CNRS, Université Paris Sud	Rapporteur
P. BERREBI	Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier II	Rapporteur
T. RIGAUD	Directeur de recherche CNRS, Université de Bourgogne	Président
F. VAVRE	Chargé de recherche CNRS, Université de Lyon I	Examinateur
F. GRANDJEAN	Professeur, Université de Poitiers	Directeur
M. JOHNSON	Maître de conférence, Université de Poitiers	Co-directrice
D. BOUCHON	Professeur, Université de Poitiers	Invité

à la mémoire de mon père

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements à Jacqui Shykoff, Directrice de recherche CNRS à l'Université de Paris-Sud, et Patrick Berrebi, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier II, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie tout autant Thierry Rigaud, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Dijon, et Fabrice Vavre, Chargé de Recherche CNRS à l'Université Lyon I, pour l'honneur qu'ils me font en examinant ce travail.

Toute ma gratitude va également à Didier Bouchon, Professeur et Directeur de l'UMR CNRS 6556, Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire sur un sujet aussi passionnant, pour m'avoir accordé toute sa confiance et son aide scientifique rigoureuse, en particulier lors de la rédaction des articles.

Un grand merci aussi à mon directeur de thèse, Frédéric Grandjean, pour ses conseils, sa confiance sans faille et l'immense liberté d'action qu'il m'a laissée tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier également ma co-directrice de thèse, Monique Johnson, pour avoir participé à l'encadrement de ce travail, dont la principale discipline, la génétique des populations, lui était peu familière. Merci également de m'avoir impliqué dans des projets extérieurs à mon sujet principal, axés sur d'autres approches que la génétique des populations.

Je me dois de remercier à nouveau Jacqui Shykoff et Fabrice Vavre pour avoir accepté de participer à mes comités de thèse, leurs discussions très constructives, leurs conseils et leur regard extérieur indispensable à la réussite de ce travail.

Je remercie également le Conseil Régional de la Région Poitou-Charentes pour avoir financé ce travail de thèse pendant trois ans (bourse région).

Un immense merci à Maryline Raimond, Carine Delaunay et Catherine Debenest pour toute l'aide technique apportée dans les manipulations, en particulier lors des extractions. Vraiment un grand merci les filles, pour tout le temps que vous m'avez fait gagner.

Un grand merci également à Daniel Guyonnet, Sylvie Patri et Jérôme Rivet pour toute l'attention qu'ils ont portée à mes réactions de séquençage et autres microsatellites.

Un remerciement tout particulier à Robert Comte qui m'a tout appris de l'élevage des cloportes et pour les soins qu'il a prodigués à mes petites bêtes. Je n'oublierai pas non plus de remercier Alexandra Lafitte, Florence et Emmanuel Duchêne pour l'aide apportée aux élevages.

Je ne peux également que remercier mes "esclaves", Nicolas Puillandre, Marion de Latude, Lenka Filipova et Johanna Jaurès, pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter, leur

bonne humeur et leur sympathie continuelles. Et je m'excuse pour les coups de martinet que certain(e)s ont pu subir.

Je tiens à remercier tout particulièrement Yves Caubet pour sa précieuse collaboration, ses discussions constructives et pour m'avoir fourni le logiciel SEXDET prêt à l'emploi, sans lequel une partie de ce travail n'aurait pas été possible.

Merci à Yves Caubet et Roland Raimond pour leur participation aux sorties terrain pour collecter ces petites bêtes dans la réserve de Chizé et braver chevreuils, sangliers et tiques.

Je ne manquerai pas de remercier l'ensemble des membres de l'UMR 6556 pour toute leur sympathie et l'ambiance de travail chaleureuse qu'ils y font régner. Je doute que la réussite de ce travail aurait été possible sans cette bonne ambiance de travail et c'est avec regret que je quitte ce laboratoire. Encore merci à tous.

Un grand merci également à tous les schtroumpfs et schtroumpfettes du labo, pour avoir supporté le grand schtroumpf et ses mœurs particulières (Woouuaaahhhh !!), pour toutes les soirées partagées, pour leur soutien permanent, leur sympathie, leur amitié

La réalisation d'une thèse et l'obtention du grade de Docteur ne sont pas pour moi, seulement le résultat de quelques années de recherche sur un thème précis, mais avant tout le couronnement de longues années d'études et l'aboutissement d'une vocation née au cours de ces études. A ce titre, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de mon éducation ou de mes études, depuis l'école primaire, jusqu'à aujourd'hui, à l'université. J'aurai une pensée toute particulière pour mes profs de biologie évolutive et de génétique des populations de l'Université de Lille, qui m'ont insufflé leur passion pour cette discipline que l'on nomme biologie évolutive.

Merci également à ma mère par son soutien constant et sa confiance durant toutes ces années d'études.

Enfin, je ne peux que remercier Carmen, pour toute sa patience et son amour pendant que je travaillais ici à réaliser ma thèse. Merci de m'avoir attendu si longtemps et si loin, sans jamais m'oublier. Merci d'avoir été à chaque instant derrière moi à me soutenir et me réconforter à chaque coup dur, malgré la distance qui nous a séparés.

Sommaire

Introduction ***9***

I. Synthèse bibliographique ***12***

A. WOLBACHIA PIPIENTIS **12**

1. PARASITES DE LA REPRODUCTION 13

B. EFFETS DE WOLBACHIA SUR LA GENETIQUE DES POPULATIONS DES HOTES **15**

1. GENOME MITOCHONDRIAL 16
   a) Diversité génétique mitochondriale 16
   b) Divergence génétique mitochondriale entre populations 18
   c) Divergence génétique mitochondriale entre espèces 19
2. STRUCTURATION GENETIQUE NUCLEAIRE 20
3. SPECIATION 21

C. DETERMINISME DU SEXE CHEZ A. VULGARE : FACTEURS IMPLIQUES ET ASPECTS EVOLUTIFS **22**

1. PHENOTYPES SEXUELS 22
2. FACTEURS IMPLIQUES 24
3. REPARTITION DANS LES POPULATIONS NATURELLES 26
4. HISTOIRE EVOLUTIVE DE *WOLBACHIA* CHEZ *A. VULGARE* 30

D. GENETIQUE DES POPULATIONS DE L'HOTE A. VULGARE **31**

1. ADN NUCLEAIRE 31
2. ADN MITOCHONDRIAL 32

II. Considérations statistiques préliminaires ***33***

A. TESTS DE BIAIS DE SEXE-RATIO **33**

B. VARIABILITE GENETIQUE INTRA-POPULATION **34**

1. POLYMORPHISME DES LOCI MICROSATELLITES 34
   a) Diversité allélique 34
   b) Hétérozygotie *H* 34
2. POLYMORPHISME DE SEQUENCE 35
   a) Diversité génique : 35
   b) Estimateur de Tajima : 35
   c) Diversité nucléotidique : 35
   d) Estimateurs de θ : 35
3. TESTS DE RECOMBINAISON 36
   a) RDP (2000) 37
   b) Bootscanning (Salminen *et al.*, 1995) 38
   c) Chimaera (Maynard Smith, 1992; Posada & Crandall, 2001) 38
   d) SiScan (Gibbs *et al.*, 2000). 39
   e) DNAsp (Hudson & Kaplan, 1985; Rozas & Rozas, 1999) 39
4. DESEQUILIBRE DE LIAISON 40

C. TEST DE DETECTION DE GOULOTS D'ETRANGLEMENT DEMOGRAPHIQUES **40**

D. TESTS DE NEUTRALITE **41**

1. TEST DE TAJIMA 42
2. TEST DE FU & LI 43
3. TEST DE FU 44

E. VARIABILITE GENETIQUE INTER-POPULATION **44**

1. TEST EXACT DE DIFFERENCIATION DES POPULATIONS 44
2. AMOVA : ANALYSE DE VARIANCE MOLECULAIRE 45
3. F_{ST} PAR PAIRE DE POPULATIONS 45

a) Méthodes basées sur les fréquences alléliques (haplotypiques) 45
b) Méthodes prenant en compte la divergence entre allèles (haplotypes). 46
F. TESTS DE MANTEL 47
G. MESURE DES FLUX DE DISPERSION NM 48
H. BIAIS DE STRUCTURATION GENETIQUE ET BIAIS DE DISPERSION LIES AU SEXE 49
1. UTILISATION DE MARQUEURS DE CLASSES DIFFERENTES 49
2. UTILISATION DE MARQUEURS DE MEME CLASSE. 50
a) Différenciation génétique des populations : F_{ST} 51
b) Ecart au modèle Hardy-Weinberg : F_{IS} 52
c) Apparentement *r* entre individus 52
d) Indice d'assignement *AI* 53
I. SEUIL DE SIGNIFICATIVITE DES TESTS MULTIPLES 53
III. Polymorphisme du parasite Wolbachia : féminisation et recombinaisons intergénomiques 55
A. INTRODUCTION 57
B. MATERIALS AND METHODS 58
1. SAMPLING AND SEQUENCING 58
2. EVOLUTIONARY ANALYSES 60
C. RESULTS 61
1. *WOLBACHIA* STRAINS POLYMORPHISM 61
2. RECOMBINATION ANALYSIS 62
3. INTERGENOMIC ORIGIN OF RECOMBINATIONS 66
4. PHYLOGENETIC ANALYSIS 66
D. DISCUSSION 67
1. EVIDENCE FOR RECOMBINATION 67
2. RECOMBINATION CONSEQUENCES ON PHYLOGENETIC ANALYSIS 67
3. INTRAGENOMIC RECOMBINATION 67
4. EVOLUTIONARY IMPLICATIONS 68
5. *W*VULC, AN INVADING STRAIN ? 69
E. ACKNOWLEDGEMENTS 70
IV. Comparaison du polymorphisme de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial : dynamique de Wolbachia et auto-stop génétique sur l'ADN mitochondrial 71
A. INTRODUCTION 74
B. MATERIALS AND METHODS 76
1. SAMPLE COLLECTION 76
2. MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES 76
3. WITHIN POPULATION DIVERSITY 77
4. NEUTRALITY TESTS 78
5. GENETIC STRUCTURE 78
C. RESULTS 79
1. WITHIN LOCALITY DIVERSITY 79
2. *WOLBACHIA*-MTDNA LINKAGE DISEQUILIBRIUM 83
3. NEUTRALITY TESTS AND BOTTLENECK DETECTION 83
4. POPULATION DIFFERENTIATION 84
D. DISCUSSION 87
1. DIVERSITY AND PREVALENCE OF *WOLBACHIA* 87
2. GENETIC VARIABILITY WITHIN POPULATIONS 88
3. HORIZONTAL TRANSFERS OF *WOLBACHIA* 89
4. IMPACT OF *WOLBACHIA* ON GENETIC DIVERSITY IN HOST POPULATIONS 89
5. EVOLUTION OF PREVALENCE OF *WOLBACHIA* IN NATURAL POPULATIONS 90
E. ACKNOWLEDGEMENTS 92

F. SUPPLEMENTARY MATERIAL: 93

V. Analyse de la structuration génétique du système hôtes/parasites A. vulgare/Wolbachia au sein d'une métapopulation 96

A. INTRODUCTION 96

B. MATERIELS ET METHODES 97

1. ECHANTILLONNAGE 97
2. METHODES MOLECULAIRES 101
   a) Extraction d'ADN 101
   b) Détection et séquençage des lignées *Wolbachia pipientis* 101
   c) Génotypage des marqueurs microsatellites 102
   d) Génotypage de l'ADN mitochondrial 103

C. RESULTATS 104

1. PREVALENCE DE *WOLBACHIA* ET PROPORTION DES SEXES 104
2. QUELQUES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES FEMELLES EN FONCTION DE LEUR STATUT D'INFECTION 108
3. POLYMORPHISME DES MARQUEURS NUCLEAIRES DE L'HOTE 110
   a) Diversité génétique 110
   b) Déséquilibre de liaison 112
4. POLYMORPHISME DU MARQUEUR MITOCHONDRIAL DE L'HOTE 112
   a) Diversité génétique 112
   b) Déséquilibre de liaison 113
5. EVOLUTION DES FREQUENCES MITOCHONDRIALES ET DES PREVALENCES DE *WOLBACHIA* 114
   a) Variation entre adultes et juvéniles 114
   b) Variation au cours des trois années d'échantillonnage 115
6. TESTS DE NEUTRALITE ET DETECTION DE GOULOT D'ETRANGLEMENT DEMOGRAPHIQUES 117
   a) Tests de goulots d'étranglement : 117
   b) Tests de neutralité sur l'ADN mitochondrial : 119
7. STRUCTURATION GENETIQUE DE L'HOTE 120
   a) Marqueurs nucléaires 120
   b) Marqueur mitochondrial 124
   c) Tests de Mantel 127

D. DISCUSSION 130

1. SYSTEME EN METAPOPULATION DANS LA RBI DE CHIZE 130
2. ORIGINE RECENTE DE LA METAPOPULATION DE LA RBI DE CHIZE 132
3. IMPACT FAVORABLE D'UNE DYNAMIQUE EN METAPOPULATION SUR LES PREVALENCES DE *WOLBACHIA* ? 133
4. RESEAU D'ILES PERIPHERIQUES ? 134

VI. Biais de structuration génétique lié au sexe : biais de dispersion lié au sexe ou effet des facteurs féminisants ? 136

A. INTRODUCTION 136

B. MATERIELS ET METHODES 137

1. DONNEES EMPIRIQUES 137
2. SIMULATIONS 137

C. RESULTATS 140

1. LOCI MICROSATELLITES 140
2. LOCUS MITOCHONDRIAL 143
3. SIMULATIONS 145
   a) Simulations en l'absence de gène de résistance 145
   b) Simulations avec un facteur féminisant en présence d'un gène de résistance 149

D. DISCUSSION 156

1. BIAIS DE STRUCTURATION DES MARQUEURS NUCLEAIRES 156
2. BIAIS DE STRUCTURATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL : EFFETS CONJOINTS D'UN BIAIS DE DISPERSION ET DES FACTEURS FEMINISANTS 158

VII. Conclusion et perspectives 160
VIII. Annexes 165
ANNEXE I. PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN TOTAL 165
ANNEXE II. SEQUENCES DE LA CYTOCHROME OXYDASE II (ADN MITOCHONDRIAL) D'A. VULGARE 166
ANNEXE III. SITES D'ETUDES DE LA RESERVE BIOLOGIQUE INTEGRALE DE CHIZE ET DES POPULATIONS PERIPHERIQUES A CELLES-CI. 168
ANNEXE IV. RESULTATS COMPLEMENTAIRES DES CHAPITRES V ET VI 172
ANNEXE V. PUBLICATIONS PARUES AU COURS DE LA THESE 186
IX. Bibliographie 187

Introduction

Parmi l'ensemble des relations symbiotiques connues, l'endosymbiose intracellulaire constitue le type de relation la plus étroite qui puisse exister entre deux organismes, puisque l'un des partenaires vit dans les cellules de son hôte. Les chloroplastes et les mitochondries constituent les cas les plus extrêmes et les plus anciens d'endosymbiose (Margulis, 1993). De par la grande diversité de leurs stratégies évolutives, les endosymbiotes bénéficient d'un intérêt croissant des biologistes de l'évolution. En effet, les relations liant les endosymbiotes à leurs hôtes sont très diverses et s'étendent du mutualisme (le symbiote augmente sa propre valeur sélective en augmentant celle des femelles-hôtes) au parasitisme de la reproduction (le parasite augmente sa valeur sélective au détriment des femelles-hôtes en manipulant leur reproduction ; Ishikawa, 2003). Les exemples d'endosymbiose sont particulièrement nombreux et diversifiés chez les arthropodes. Parmi celles-ci, *Wolbachia pipientis* est de loin le parasite de la reproduction le plus largement étudié, tant sur l'analyse des interactions (phénotypes induits, mode d'action, immunité de l'hôte, etc.) que sur les aspects évolutifs (évolution du génome, dynamique d'invasion, caractérisation des pressions de sélection, etc.). C'est aussi celui qui présente la plus grande diversité de phénotypes induits : incompatibilité cytoplasmique, féminisation, mort des mâles, parthénogenèse et réalisation de l'ovogenèse (O'Neill *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999b; Werren, 1997). D'autre parasites de la reproduction sont néanmoins connus chez les arthropodes et bénéficient d'un intérêt croissant de la part des chercheurs. On peut citer :

- *Cardinium*
  - féminisation chez les acariens *Brevipalpus phoenicis* et *B. californicus* (Chigira & Miura, 2005; Weeks *et al.*, 2001)
  - incompatibilité cytoplasmique chez l'hyménoptère *Encarsia pergandiella* et des acariens (Gotoh *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2003)
  - parthénogenèse chez *Encarsia hispida* (Zchori-Fein *et al.*, 2001; Zchori-Fein & Perlman, 2004)
  - augmentation de la fécondité chez l'acarien *Metaseiulus occidentalis* (Weeks & Stouthamer, 2004)]
- des *Flavobacteria* non décrites qui induisent la mort des mâles chez les coccinelles *Adonia variegata* et *Coleomegilla maculata* (Hurst *et al.*, 1997)
- *Spiroplasma* qui induisent la mort des mâles chez *Drosophila willistoni* et la coccinelle *Adalia bipunctata* (Hurst *et al.*, 1999b)]

- *Arsenophonus* qui induisent la mort des mâles chez la guêpe parasitoïde *Nasonia vitripennis* (Gherna *et al.*, 1991)]
- *Rickettsia* qui induisent la mort des mâles chez *Adalia bipunctata* (Hurst *et al.*, 1999b)]
- des microsporidies qui induisent la féminisation chez *Gammarus duebeni* (Ironside *et al.*, 2003a; Ironside *et al.*, 2003b).

De part leur mode de transmission et les manipulations infligées à leurs hôtes, les parasites de la reproduction sont susceptibles d'affecter non seulement la reproduction de leurs hôtes, mais également d'autres aspects de leur biologie et en particulier la structuration génétique des populations d'hôtes. En effet, leur transmission maternelle via le cytoplasme des œufs crée un déséquilibre d'association important avec l'ensemble des éléments du cytoplasme, y compris l'ADN mitochondrial. La propagation des endosymbiotes va donc affecter la diversité génétique et la structuration génétique mitochondriale des populations hôtes (Hurst & Jiggins, 2005). Cependant, les parasites de la reproduction peuvent aussi influencer la diversité et la structuration de l'ADN nucléaire (Engelstadter & Hurst, 2007; Telschow *et al.*, 2006) et semblent jouer un rôle dans les évènements de spéciation de leurs hôtes (Charlat *et al.*, 2003a; Rokas, 2000; Weeks *et al.*, 2002). L'analyse du polymorphisme et de la structuration génétique des hôtes permet de mieux comprendre la dynamique et les forces évolutives régulant les prévalences des parasites de la reproduction dans le milieu naturel.

Parmi les nombreuses espèces d'arthropodes infectées par des endosymbiotes parasites de la reproduction, *Armadillidium vulgare* présente l'originalité d'être infecté par deux souches de *Wolbachia* féminisantes. Depuis leur découverte récente (Cordaux *et al.*, 2004), un important travail est mené à l'UMR CNRS 6556 de l'Université de Poitiers, afin de comparer les stratégies évolutives de ces deux associations et comprendre leur dynamique dans les populations naturelles. Les premiers résultats indiquent qu'elles possèdent des traits d'histoire de vie différents (M. Johnson, pers.comm.), mais leurs prévalences sont encore mal connues en milieu naturel.

L'objectif de ce travail est de comprendre quel est l'impact des souches de *Wolbachia* sur la structuration génétique des populations d'*A. vulgare* et d'appréhender la dynamique des prévalences des souches de *Wolbachia* dans les populations naturelles. La première étape de ce travail a été d'analyser le polymorphisme et les prévalences des différentes souches de *Wolbachia* au sein des populations d'*A. vulgare.* Dans un second temps, le polymorphisme et la structuration génétique de l'hôte ont été étudiés à l'aide d'un marqueur mitochondrial et de marqueurs nucléaires (microsatellites) avec trois objectifs principaux :

1/ caractériser la structuration génétique de l'hôte

2/ apporter des éléments de réponse pour mieux comprendre l'évolution des prévalences de *Wolbachia* dans les populations naturelles

3/ analyser les effets des facteurs féminisants sur le polymorphisme et la structuration génétique de l'hôte. Deux échelles géographiques ont été utilisées. Les prévalences de *Wolbachia,* le polymorphisme et la structuration génétiques de l'hôte ont été analysées parmi treize populations échantillonnées à une échelle subrégionale. Le même travail a ensuite été mené à une échelle géographique réduite, au sein d'une métapopulation afin d'analyser l'impact d'une dynamique extinction-recolonisation et des flux de gènes sur la dynamique de *Wolbachia.* Cette étude, couplée à des simulations, a également permis de mettre en évidence les effets de *Wolbachia* sur l'ADN mitochondrial. De manière plus inattendue, les analyses de biais de structuration génétique suggèrent aussi un effet des facteurs féminisants (*Wolbachia* et *f*) sur l'ADN nucléaire.

I. Synthèse bibliographique

A. *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis est une α-protéobactérie, parasite intracellulaire obligatoire proche des genres *Ehrlichia*, *Anaplasma* et *Neorickettsia* (O'Neill *et al.*, 1992). Elle a été découverte par Hertig et Wolbach (1924) dans les ovaires du moustique *Culex pipiens* et décrite en 1936 (Hertig, 1936). Sa transmission est strictement maternelle via le cytoplasme des ovocytes. Elle infecte une grande variété de nématodes (Bandi *et al.*, 1998; Taylor & Hoerauf, 1999) et d'arthropodes : 17 à 75% des insectes (Jeyaprakash & Hoy, 2000; Plantard *et al.*, 1999; Wenseleers *et al.*, 1998; Werren *et al.*, 1995a; Werren & Windsor, 2000), des crustacés (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001) et des chélicérates (acariens et araignées ; Breeuwer & Jacobs, 1996; Gotoh *et al.*, 2003; Rowley *et al.*, 2004). Chez les isopodes terrestres, elles infectent 46,3% des espèces (Bouchon *et al.*, 1998). La diversité des hôtes infectés suggère que *Wolbachia* est un parasite très ubiquiste qui possède de grandes capacités d'adaptation à des hôtes différents (Rigaud & Rousset, 1996; Rigaud, 1999).

Les phylogénies moléculaires de *Wolbachia* suggèrent l'existence de dix clades plus ou moins spécialisés sur un type d'hôtes (Figure I-1). Bien que formant chacun un groupe apparemment monophylétique, les relations phylogénétiques de ces groupes ne sont pas clairement établies (Lo *et al.*, 2007). La majorité des lignées *Wolbachia* infectant des arthropodes appartient à deux clades étroitement apparentés A et B (Werren *et al.*, 1995b). Toutes les lignées *Wolbachia* trouvées jusqu'à maintenant chez les isopodes terrestres appartiennent au clade B et la plupart forme un sous-clade nommé *w*Oni (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001; Cordaux *et al.*, 2004). Très proche des clades A et B, le clade G a été récemment proposé sur la base de phylogénie du gène *wsp* (Rowley *et al.*, 2004). Il comprend des lignées *Wolbachia* infectant des araignées. Cependant, une étude récente basée sur d'autres gènes remet en question l'existence de ce clade et semble indiquer qu'il est en fait constitué de lignées recombinantes des clades A et B (Baldo & Werren, 2007). D'autres lignées de *Wolbachia* trouvées chez des arthropodes forment des clades phylogénétiquement plus éloignés : E (collemboles ; Czarnetzki & Tebbe, 2004; Vandekerckhove *et al.*, 1999), F (arthropodes et nématodes filaires ; Campbell *et al.*, 1992; Casiraghi *et al.*, 2005) et H (termites ; Bordenstein & Rosengaus, 2005). La plupart des lignées *Wolbachia* trouvées chez les filaires forme deux autres clades C et D (Bandi *et al.*, 1998). Enfin deux lignées *Wolbachia* très divergentes et trouvées chez *Dirofilaria repens* (filaire) et chez diverses

espèces de puces ont été assignées chacune à un clade spécifique (Casiraghi *et al.*, 2005; Gorham *et al.*, 2003). Les divergences entre lignées de *Wolbachia* peuvent être importantes et leurs statuts spécifiques ne sont pas clairement définis. Cependant, étant donné l'existence d'échanges de matériel génétique entre lignées (recombinaisons intergénomiques entre les supergroupes A et B, bactériophages, etc. ; voir par exemple Baldo *et al.*, 2005a; Baldo *et al.*, 2005b; Bordenstein & Wernegreen, 2004; Jiggins *et al.*, 2001b; Jiggins, 2002; Werren & Bartos, 2001), Lo *et al.* (2007) ont proposé de considérer l'ensemble des supergroupes A-H et des deux lignées qui présentent une divergence comparable avec la lignée originale décrite chez *Culex pipiens*, comme une seule et même espèce *Wolbachia pipientis*.

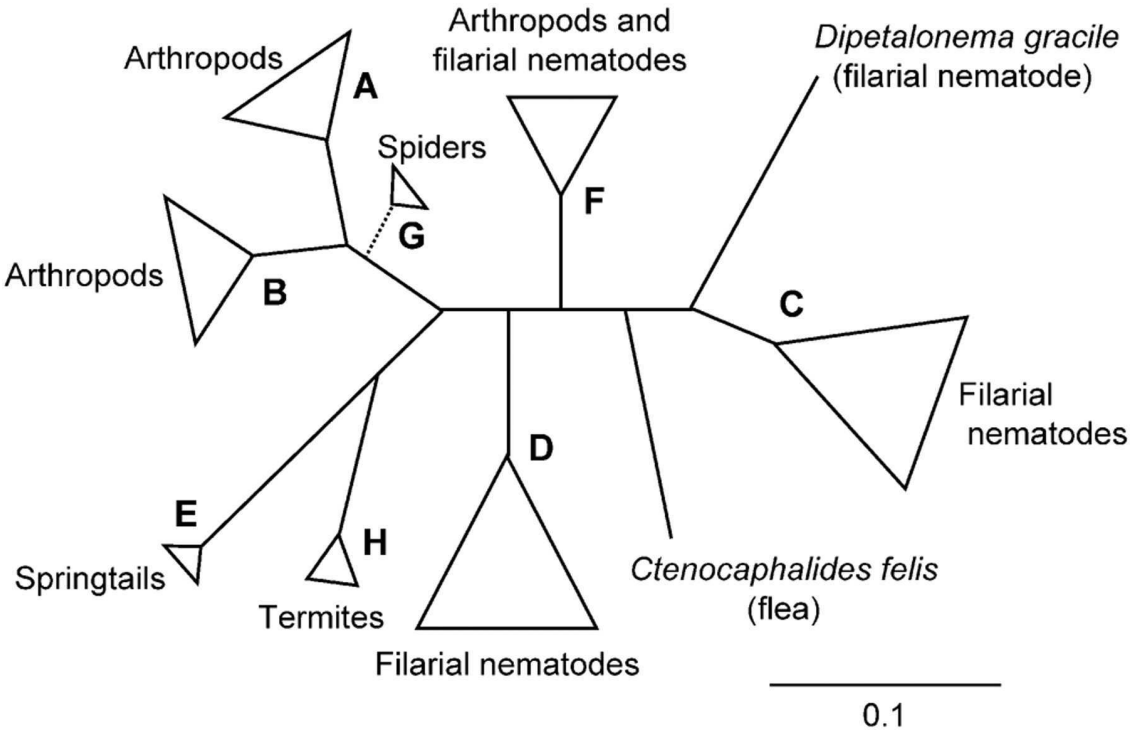


Figure I-1 Représentation schématique des relations phylogénétiques de *Wolbachia pipientis* basées sur les gènes *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *dnaA*. Les lettres correspondent aux clades confirmés à l'aide des quatre gènes. La position du clade G est incertaine et proposée sur la base des gènes wsp et 16S rRNA (d'après Lo *et al.*, 2007).

1. Parasites de la reproduction

Afin d'augmenter son taux de transmission maternelle à la génération suivante, *Wolbachia* induit un certain nombre d'altérations de la reproduction des hôtes infectés (O'Neill *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999b; Werren, 1997). Ces altérations dépendent à la fois de la lignée bactérienne (Charlat *et al.*, 2003b; Dedeine *et al.*, 2004; Hiroki *et al.*, 2004; James & Ballard, 2000) et de l'hôte (Boyle *et al.*, 1993; Poinsot *et al.*, 1998; Reynolds & Hoffmann, 2002; Reynolds *et al.*, 2003). Les principaux effets de l'infection par *Wolbachia* sont les suivants :

- **Incompatibilité cytoplasmique :** L'incompatibilité cytoplasmique a été décrite dès les années 1950 chez *Culex pipiens* (Ghelelovitch, 1952) mais la responsabilité de *Wolbachia* dans ce phénomène n'a été mise en évidence que dans les années 1970 (Yen & Barr, 1971; Yen & Barr, 1973). L'incompatibilité cytoplasmique constitue le phénotype le plus fréquemment induit par *Wolbachia* (Charlat & Mercot, 2001; Hoffmann & Turelli, 1997). Elle a en effet été décrite chez des hôtes très divers (insectes, crustacés, acariens) dont notamment deux isopodes terrestres : *Porcellio dilatatus* (Legrand & Juchault, 1986) et *Cylisticus convexus* (Moret *et al.*, 2001). Le croisement entre un mâle infecté par *Wolbachia* et une femelle non-infectée se traduit par la mort des embryons. Si la femelle est infectée, le croisement est viable aussi bien avec un mâle infecté qu'avec un mâle non infecté. On peut observer un phénomène similaire si le mâle et la femelle sont infectés par des souches de *Wolbachia* différentes. Dans ce cas on parle d'incompatibilité cytoplasmique bidirectionnelle.
- **Mort des mâles (Male-killing) :** *Wolbachia* induit la mort des mâles issus de femelles infectées (Hurst & Jiggins, 2000; Stevens *et al.*, 2001). Cet effet a été observé chez des coléoptères (Fialho & Stevens, 2000; Hurst *et al.*, 1999a), des lépidoptères (Fujii *et al.*, 2001; Jiggins *et al.*, 2000a; Jiggins *et al.*, 2000b) et un diptère (Hurst *et al.*, 2000). La mort des mâles n'a pas d'effet négatif sur *Wolbachia* parce qu'elle n'est transmise que par la voie femelle. Elle procure au contraire un avantage si les filles profitent d'un avantage de la mort de leurs frères, par exemple en les mangeant (chez la coccinelle et le ténébrion), en réduisant la compétition entre les descendants ou en limitant le risque de croisements entre apparentés. Les filles des femelles infectées par *Wolbachia* ont alors une valeur sélective supérieure à celle des filles des femelles non-infectées.
- **Féminisation :** La féminisation des mâles génétiques a été clairement démontrée chez plusieurs espèces d'isopodes terrestres (Bouchon *et al.*, 1998; Juchault *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1973), un lépidoptère (Hiroki *et al.*, 2002; Hiroki *et al.*, 2004) et plus récemment chez une espèce de ciccadelle (Negri *et al.*, 2006). La féminisation des mâles génétiques entraîne une forte

augmentation du nombre de femelles dans la descendance (> 50%) et favorise donc le taux de transmission de *Wolbachia* aux petites-filles.

- **Parthénogenèse thélytoque :** chez les espèces haplodiploïdes (hyménoptères, thrips et acariens ; voir Stouthamer, 1997 pour revue), les mâles (haploïdes) se développent à partir d'œufs non fécondés (parthénogenèse arrhénotoque) et les femelles (diploïdes) à partir d'œufs fécondés. *Wolbachia* va induire également une diploïdisation des œufs haploïdes qui vont se développer en femelles, les rendant diploïdes. Les femelles infectées sont ainsi produites de manière asexuée. Leur descendance contient alors deux fois plus de filles que celles des femelles non-infectées, ce qui permet la transmission de *Wolbachia* à deux fois plus de petites-filles.
- **Réalisation de l'ovogenèse :**, une des trois lignées *Wolbachia* (*w*Atab3) présente chez l'hyménoptère parasitoïde *Asobara tabida* est nécessaire à l'ovogenèse (Dedeine *et al.*, 2001; Dedeine *et al.*, 2005).

B. *Effets de* Wolbachia *sur la génétique des populations des hôtes*

De nombreuses études se sont intéressées aux effets de *Wolbachia* sur la diversité génétique mitochondriale (par exemple : Ballard & Kreitman, 1994; par exemple : Ballard *et al.*, 1996; Baudry *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2003; Jiggins, 2003; Kambhampati *et al.*, 1992; Marshall, 2004; Narita *et al.*, 2006; Rasgon *et al.*, 2006; Reuter & Keller, 2003; Rokas *et al.*, 2001; Schulenburg *et al.*, 2002; Shoemaker *et al.*, 2004). En effet, *Wolbachia* est transmise maternellement avec le cytoplasme et les mitochondries. En manipulant la reproduction de son hôte, *Wolbachia* favorise les femelles infectées, et par conséquent le cytoplasme et les mitochondries des lignées infectées vont augmenter en fréquence dans la population. *Wolbachia* se retrouve alors en déséquilibre d'association avec l'ADN mitochondrial (Hurst & Jiggins, 2005). Un tel déséquilibre d'association n'est cependant possible que si les transferts horizontaux sont rares ou inexistants. Plusieurs études ont montré leur existence, parfois à des fréquences élevées (Huigens *et al.*, 2000; Huigens *et al.*, 2004). Chez les espèces qui présentent un fort taux de transmission horizontal, l'auto-stop génétique de *Wolbachia* sur l'ADN mitochondrial est inexistant et *Wolbachia* n'a alors que peu d'effets sur l'ADN mitochondrial. Cette situation semble cependant être l'exception et la transmission de *Wolbachia* est essentiellement verticale chez la plupart des espèces.

Le balayage sélectif (forte augmentation en fréquence d'une mutation bénéfique dans la population) peut avoir lieu sur *Wolbachia,* mais également sur d'autres symbiotes transmis maternellement comme *Cardinium* ou *Spiroplasma,* sur la mitochondrie elle-même ou sur le chromosome *W* en cas d'hétérogamie femelle. L'ensemble des effets présentés dans cette partie ne sont donc pas propres à *Wolbachia* et *Wolbachia* n'est pas forcément à l'origine d'un patron particulier de diversité ou de structuration génétique de l'ADN mitochondrial. Hurst & Jiggins (2005) ont présenté une synthèse récente des effets non seulement de *Wolbachia* mais d'autres parasites de la reproduction sur la diversité génétique mitochondriale. Un goulot d'étranglement démographique peut également affecter de la même façon le polymorphisme mitochondrial. Cependant, dans ce dernier cas, les génomes nucléaires et mitochondriaux sont affectés et leur comparaison permet d'éliminer les causes démographiques pouvant expliquer un patron de polymorphisme particulier.

1. Génome mitochondrial

a) Diversité génétique mitochondriale

Selon le nombre de lignées bactériennes présentes et l'ancienneté de l'invasion de *Wolbachia*, la diversité génétique mitochondriale peut être augmentée ou diminuée et le polymorphisme est altéré (fréquence des mitotypes, répartition des mutations entre les mitotypes, etc.). L'augmentation de la prévalence de *Wolbachia* dans une population va considérablement réduire le polymorphisme mitochondrial de la population et distordre les fréquences des mitotypes par auto-stop génétique (par exemple un mitotype majoritaire associé à *Wolbachia* et plusieurs mitotypes rares non associés à *Wolbachia*). Si de nouveaux variants de *Wolbachia* plus compétitifs apparaissent par mutation ou par transferts horizontaux, leurs invasions successives de la popultion hôte, vont encore réduire le polymorphisme mitochondrial (Maynard-Smith & Haigh, 1974; Tajima, 1989). Plusieurs études ont montré que les infections par *Wolbachia* sont associées à un faible polymorphisme mitochondrial. Par exemple, trois populations de *Drosophila simulans* peu infectées par des *Wolbachia* induisant l'incompatibilité cytoplasmique présentent un polymorphisme plus élevé que toutes les autres populations infectées (Dean *et al.*, 2003). Chez *Porcellionides pruinosus*, une absence totale de polymorphisme mitochondrial dans les populations françaises semble provoquée par des *Wolbachia* féminisantes (Marcadé *et al.*, 1999). *Wolbachia* semble également avoir affecté le polymorphisme mitochondrial de la chrysomèle *Aphthona nigricustis* (Roehrdanz *et al.*, 2006). On distingue en effet deux clades mitochondriaux chez cette espèce. 78% des individus appartiennent au clade A qui ne comprend qu'un seul

mitotype associé à *Wolbachia* (86% d'infection dans ce clade). Les autres individus possèdent l'un des 15 haplotypes du clade B et aucun n'est infecté par *Wolbachia*.

Dans le cas d'infections multiples par plusieurs souches de *Wolbachia* (par exemple : Hiroki *et al.*, 2004; Mouton *et al.*, 2004; Reuter & Keller, 2003), on peut s'attendre à une dynamique qualitativement similaire à celle observée dans le cas d'infections simples. Lorsqu'un polymorphisme d'infection est observé, le résultat peut par contre être différent, notamment si les différentes souches de *Wolbachia* présentes dans la population sont associées à des mitotypes différents. Dans ce cas, un balayage sélectif par une souche de *Wolbachia* peut réduire le polymorphisme au sein d'une lignée de femelles. Cependant, la présence simultanée de plusieurs souches de *Wolbachia* dans la population (avec différentes classes d'infection) peut maintenir un certain polymorphisme au sein de la population. Dans ce cas, la généalogie des mitotypes présents dans la population comprend une majorité de branches internes longues et des branches externes courtes. Ce phénomène n'est pas directement lié à un phénotype particulier et a été constaté avec des *Wolbachia* induisant de l'incompatibilité cytoplasmique ou pratiquant la mort des mâles (Hiroki *et al.*, 2004; Jiggins, 2003; Reuter & Keller, 2003)

Comme nous venons de le voir, *Wolbachia* influence le polymorphisme mitochondrial des individus infectés à l'échelle de la population. Cependant, *Wolbachia* peut également influencer le polymorphisme des individus non-infectés d'une population. En effet, *Wolbachia* ne possède pas un taux de transmission à la descendance de 100% alors que les mitochondries ont une transmission parfaite. Il y a donc une production continue d'individus non infectés qui possèdent le mitotype associé à l'infection. Si ces individus comprennent des femelles, leur mitotype pourra se maintenir dans le pool d'individus non-infectés. A cause de la production continue de ces individus par les femelles infectées, la fréquence du mitotype initialement associé à *Wolbachia* va alors augmenter régulièrement en fréquence dans le pool d'individus non-infectés. Ce processus unidirectionnel va entraîner une forte réduction des fréquences des mitotypes originaux dans le pool d'individus non-infectés. Ce phénomène va cependant dépendre du taux de transmission du parasite et de l'ancienneté de l'invasion (Johnstone & Hurst, 1996; Turelli *et al.*, 1992). En effet, plus l'infection est ancienne et moins le taux de transmission de *Wolbachia* est élevé (donc la production d'individus non-infectés), plus la réduction du polymorphisme mitochondrial des individus infectés est importante. Chez les papillons *Acraea encedon* et *A. encedana,* l'infection par *Wolbachia* (tueuses de mâles chez les deux espèces) est plus ancienne et présente un taux de transmission inférieur chez la première

espèce, *A. encedon*, qui ne présente aucun polymorphisme mitochondrial, alors que la diversité mitochondriale n'est réduite que chez les individus infectés chez *A. encedana* (Jiggins, 2003).

Lorsque l'infection par *Wolbachia* est ancestrale dans la population, des mutations neutres peuvent avoir eu le temps d'apparaître sur l'ADN mitochondrial associé à *Wolbachia*. Le polymorphisme mitochondrial de la population peut alors ressembler à ce qui est attendu sous l'hypothèse de neutralité. Une telle situation a été observée dans le cas de *Wolbachia* induisant de l'incompatibilité cytoplasmique chez une chrysomèle et un grillon (Keller *et al.*, 2004; Marshall, 2004). Cependant, cette situation semble rare et l'ADN mitochondrial ne retrouve généralement pas son niveau de polymorphisme initial (Hurst & Jiggins, 2005). D'une part, l'apparition de mutations favorables dans le génome de *Wolbachia* peut être à l'origine d'une sélection directe sur le parasite, qui se traduit par de nouveaux balayages sélectifs sur l'ADN mitochondrial par auto-stop génétique. D'autre part, l'infection par *Wolbachia* réduit la taille effective de l'ADN mitochondrial pour deux raisons. La première, déjà mentionnée, est la transmission imparfaite de *Wolbachia* à la descendance qui fait que seules les mutations apparues chez les individus infectés peuvent envahir et se fixer dans la population. La taille effective de population est alors réduite à celle des femelles infectées (Johnstone & Hurst, 1996). Ce phénomène sera d'autant plus marqué pour des prévalences faibles de *Wolbachia.* Une telle situation est observée chez *Drosophila innubila* (35% d'infection par une souche de *Wolbachia* qui induit la mort des mâles) qui présente une diversité mitochondriale réduite comparée à l'espèce proche et non-infectée *D. falleni* (Dyer & Jaenike, 2004). La deuxième raison qui explique la réduction de la taille effective de population est un effet plus important de la sélection purifiante sur l'ADN mitochondrial en présence d'un symbiote. En effet, la sélection purifiante élimine l'ensemble des cytoplasmes qui possèdent des mutations délétères (affectant les mitochondries, *Wolbachia* ou tout autre élément cytoplasmique) et réduit d'autant la taille effective de population de l'ADN mitochondrial (Charlesworth *et al.*, 1993). Les mutations qui apparaissent dans le génome de *Wolbachia* s'ajoutent à celles des autres éléments cytoplasmiques et la sélection purifiante élimine l'ensemble. Ainsi, en présence de *Wolbachia*, le taux de mutation de l'ensemble des éléments du cytoplasme est environ dix fois plus élevé que celui des mitochondries seules (Ochman *et al.*, 1999; Tamura, 1992; Wernegreen, 2002).

b) Divergence génétique mitochondriale entre populations

Deux effets contraires peuvent être observés selon le nombre de souches de *Wolbachia* en compétition : soit une réduction, soit une augmentation de la différenciation génétique des

populations. Dans le cas où une seule souche de *Wolbachia* est présente, *Wolbachia* peut se propager de populations en populations par des événements de migration et entrainer le mitotype qui lui est associé par auto-stop génétique. L'absence de souche compétitrice permet une libre invasion des populations par *Wolbachia,* ce qui entraîne une homogénéisation de leur composition génétique mitochondriale par auto-stop génétique. Cette propagation n'affecte pas la structuration génétique du génome nucléaire. L'analyse seule de l'ADN mitochondrial montre alors une absence de structuration génétique alors que l'analyse de marqueurs nucléaires peut indiquer des populations structurées. Une telle situation est observée par exemple chez *Porcellionides pruinosus* (*Wolbachia* féminisantes ; Verne *et al,* données non publiées) ou chez *Drosophila simulans* (incompatibilité cytoplasmique ; Turelli *et al.*, 1992). Dans le cas où les populations sont infectées de manière hétérogène, on s'attend au contraire à une augmentation de la différenciation génétique de l'ADN mitochondrial. La présence d'une souche de *Wolbachia* résidente (associé à un mitotype donné) peut empêcher par compétition la propagation d'une souche étrangère (associé à un autre mitotype) dans la population et donc limiter les flux de gènes entre populations. Un tel phénomène a été décrit notamment dans le cas de *Wolbachia* induisant (i) de l'incompatibilité cytoplasmique chez les diptères *Drosophila simulans* (James & Ballard, 2000) et *Protocalliphora* (Baudry *et al.*, 2003) et (ii) la mort des mâles chez le papillon *Acraea encedon* (Jiggins, 2003).

c) Divergence génétique mitochondriale entre espèces

Suite à un événement d'hybridation, *Wolbachia* peut être transférée horizontalement d'une espèce à une autre avec le cytoplasme qui lui est associé. Bien que se trouvant chez un hôte auquel elle est peu adaptée, *Wolbachia* peut envahir l'espèce et entrainer avec elle par auto-stop génétique le mitotype auquel elle était associée chez la première espèce. On observe alors le même mitotype chez les deux espèces. Ce phénomène a été observé à plusieurs reprises, en particulier chez des espèces de drosophiles. Le premier cas publié concerne l'introgression de l'ADN mitochondrial associé à la souche de *Wolbachia wMa* de *D. simulans* dans l'espèce proche *D. mauritiana* (incompatibilité cytoplasmique ; Ballard, 2000b; Rousset & Solignac, 1995). La comparaison des relations phylogénétiques des mitotypes présents chez *D. mauritiana* et *D. simulans*, avec les phylogénies basées sur l'ADN nucléaire, montre clairement que le mitotype *ma*I présent chez *D. mauritiana* et associé à la souche de *Wolbachia w*Ma, provient de l'espèce *D. simulans.* Le même phénomène d'introgression a également été observé de *Acraea encadana* vers *A. encedon* (mort des mâles ; Jiggins, 2003), entre deux espèces sœurs de lépidoptères (incompatibilité cytoplasmique chez les formes jaune et brune d'Eurema

hecabe ; Narita *et al.*, 2006) et entre trois espèces proches du sous-groupe *D. melanogaster : D. santomea, D. yakuba* et *D. teissieri* qui possèdent des séquences de Cytochrome Oxydase I très proches et la même souche de *Wolbachia* (Lachaise *et al.*, 2000). La conséquence principale de ces événements d'introgression est une forte réduction de la divergence génétique de l'ADN mitochondrial entre les espèces concernées.

Wolbachia peut au contraire accélérer la vitesse de divergence de l'ADN mitochondrial. Comme discuté plus haut, *Wolbachia* induit une réduction de la taille effective de population de l'ADN mitochondrial du fait de balayages sélectifs récurrents, causés par la succession de différentes souches de *Wolbachia.* Il a été montré que plusieurs espèces d'endosymbiotes asexués ont connu des rythmes d'évolution moléculaire accélérés par rapport aux formes libres apparentées (voir par exemple Abbot & Moran, 2002; Clark *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2002; Moran, 1996; Peek *et al.*, 1998). A chaque invasion de la population par un nouveau variant de *Wolbachia* apparu par mutation, le balayage sélectif induit va réduire la taille effective de l'ADN mitochondrial de la lignée de femelles infectées à un individu. On peut alors s'attendre à une accumulation de mutations faiblement délétères sur l'ADN mitochondrial de l'espèce hôte, dans la lignée de femelles infectées par *Wolbachia*. En effet, si une mutation apparue sur *Wolbachia* présente un avantage supérieur au coût des mutations faiblement délétères portées par l'ADN mitochondrial associé, elle augmente en fréquence dans la population. Elle entraîne avec elle par auto-stop génétique l'ensemble des autres mutations présentes dans le cytoplasme. Récemment, Shoemaker *et al.* (2004) ont comparé le polymorphisme mitochondrial de deux espèces proches *Drosophila recens* qui est infectée par *Wolbachia* (incompatibilité cytoplasmique) et *D. subquinaria* qui n'est pas infectée par *Wolbachia.* Ils ont montré une réduction du polymorphisme de l'ADN mitochondrial associé à une augmentation du nombre de mutations faiblement délétères de celui-ci chez l'espèce infectée par *Wolbachia,* ce qui suggère que *Wolbachia* accélère la vitesse d'évolution de l'ADN mitochondrial tout en réduisant son polymorphisme.

2. Structuration génétique nucléaire

Peu d'études se sont intéressées aux effets que pouvait avoir *Wolbachia* sur la structuration génétique nucléaire des populations de son hôte. Deux études récentes se sont cependant intéressées de manière théorique aux effets des bactéries induisant la mort des mâles (dont *Wolbachia*) sur le polymorphisme de l'ADN nucléaire (Engelstadter & Hurst, 2007; Telschow *et al.*, 2006). Engelstadter & Hurst (2007) ont montré un effet sur le polymorphisme intrapopulationnel d'autant plus important que la prévalence des parasites tueurs de mâles y est

élevée. En effet, la valeur sélective des femelles infectées est fortement réduite par la mort de leurs fils et le fort taux de transmission du parasite à la descendance induit un déséquilibre de liaison fort entre la bactérie et les mutations apparues chez les individus infectés. La combinaison de ces deux effets a pour conséquence une forte réduction des flux de gènes des individus infectés (femelles) vers les individus non-infectés, même en cas de transmission imparfaite des bactéries tueuses de mâles. Dans une telle situation, les femelles infectées contribuent peu ou pas du tout à la composition génétique de la population sur le long terme, quelque soit leur nombre dans la population. Une mutation favorable apparue chez un individu infecté n'a ainsi aucune chance de se répandre dans la population en cas de transmission parfaite de la bactérie. La réduction de valeur sélective des femelles infectées signifie aussi une réduction de la taille effective de la population et donc une réduction de la diversité génique de la population. La propagation de mutations favorables apparues chez les individus non-infectés est limitée par cette réduction de taille effective (stochasticité plus importante) et celle des mutations délétères au contraire facilitée.

Telschow *et al.* (2006) se sont intéressés, également par des simulations, à l'impact des bactéries tueuses de mâles sur les flux de gènes entre populations. Notamment, l'infection par des bactéries tueuses de mâles peut se traduire par un renforcement des flux de gènes efficaces entrant dans la population du fait de la réduction de la taille efficace de la population infectée par rapport aux populations non infectées ou à des populations présentant des prévalences d'infection plus faibles. Cela se traduit également par une réduction des flux de gènes sortant de la population infectée. L'infection par des bactéries tueuses de mâles peut donc induire des flux de gènes fortement asymétriques entre les populations, c'est-à-dire une dynamique de type sources/puits génétiques. Les puits génétiques sont constitués par les populations où la sélection favorise des prévalences fortes de bactéries tueuses de mâles et les sources génétiques par les populations où la sélection empêche de fortes prévalences de ces parasites.

3. Spéciation

Wolbachia a longtemps été suspectée de jouer un rôle dans la différenciation génétique des populations et la spéciation car elle est capable de modifier les capacités reproductives des mâles et des femelles sans qu'il n'y ait eu une coévolution longue avec son hôte (West *et al.*, 1998). En particulier, *Wolbachia* est capable de limiter les flux de gènes entre des populations infectées par des souches bactériennes différentes si celles-ci induisent une incompatibilité cytoplasmique bidirectionnelle. Elle peut également favoriser la mise en place de mécanismes

d'isolement prézygotiques en réduisant la valeur sélective des croisements entre populations (Telschow *et al.*, 2005; West *et al.*, 1998). Plusieurs exemples suggérant ce rôle ont été décrits chez *Drosophila* (Shoemaker *et al.*, 1999), *Tribolium* (Wade & Stevens, 1985; Wade & Chang, 1995) et des guêpes parasitoïdes (Breeuwer & Werren, 1990). Cependant, il est difficile de savoir si un isolement reproducteur entre deux espèces proches est apparu avant ou après l'infection par des souches *Wolbachia* différentes. Le travail de Bordenstein *et al.* (2001) semble montrer que *Wolbachia* peut induire un isolement reproducteur entre deux espèces avant l'apparition d'autres mécanismes d'isolement reproducteur (comme la stérilité ou la non-viabilité des hybrides). En effet les croisements interspécifiques entre les guêpes parasitoïdes *Nasonia giraulti* et *N. longicornis* indiquent que *Wolbachia* réduit fortement la viabilité des hybrides. Par contre, si on traite les individus aux antibiotiques pour éliminer *Wolbachia,* on obtient des hybrides viables des deux espèces. Cependant, il est difficile d'affirmer que *Wolbachia* est à l'origine de cet événement de spéciation (en particulier parce qu'elles vivent en allopatrie) et la question du rôle de *Wolbachia* dans la spéciation des hôtes est toujours controversée (Charlat *et al.*, 2003a; Rokas, 2000; Weeks *et al.*, 2002).

C. Déterminisme du sexe chez A. vulgare : facteurs impliqués et aspects évolutifs

1. Phénotypes sexuels

Chez *A. vulgare,* les mâles se reconnaissent aisément à la présence de deux stylets copulateurs (endopodytes) au niveau du pléon (Figure I-2). Les femelles possèdent deux ouvertures génitales situées en face ventrale au niveau du cinquième péréonite. Chaque ouverture génitale est reliée à un ovaire. La fécondation étant interne, le mâle doit donc inséminer successivement l'ovaire droit puis l'ovaire gauche (ou l'inverse) de la femelle pour féconder la totalité des ovocytes. D'autres caractères sexuels secondaires peuvent être utilisés comme la présence de brosses de poils sur les pattes des mâles. Il existe également des intersexués stériles ou non. On distingue trois types d'intersexués :

- intersexués femelles qui sont des femelles fonctionnelles avec des petits endopodites mâles (Figure I-2)
- intersexués mâles qui sont stériles et possèdent des gonopodes mâles incomplets
- mâles fonctionnels à ouvertures génitales femelles.

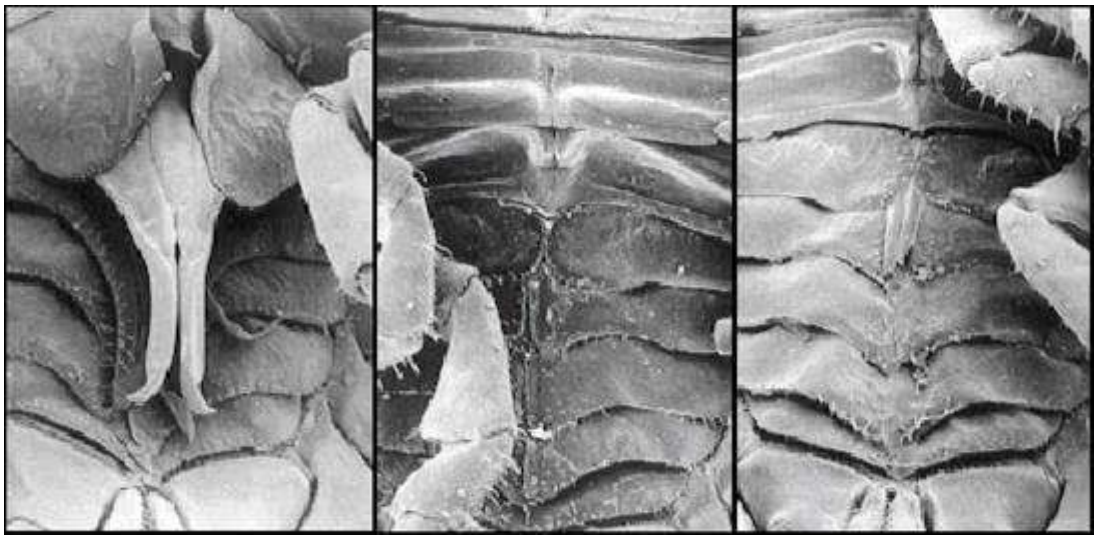


Figure I-2 Photos de la face ventrale du pléon de trois phénotypes sexuels d'*Armadillidium vulgare*. A gauche, un mâle (deux stylets copulateurs), au centre, une femelle (pas de stylets copulateurs) et à droite, un intersexué femelle (stylets copulateurs très courts, asymétriques et non-fonctionnels).

Biologie générale d' *Armadillidium vulgare*

Armadillidium vulgare fait partie des isopodes terrestres (sous-ordre Oniscidea) au sein de la sous-classe des Malacostracés de la classe des Crustacés. Ils sont communément appelés cloportes ou cochons de Saint-Antoine. Les isopodes terrestres font partie des crustacés les mieux adaptés à la vie terrestre. Parmi leurs adaptations les plus importantes, nous pouvons citer l'aplatissement dorso- ventral du corps, une évapotranspiration tégumentaire réduite, un système respiratoire aérien (pseudo- trachées), le comportement d'agrégation qui limite les pertes en eau et la formation d'un marsupium (poche ventrale formée par des expansions des endopodites) chez les femelles qui protègent les œufs puis les juvéniles des prédateurs et de la dessiccation. *A. vulgare* est probablement l'espèce française la mieux adaptée au milieu aérien sec (Vandel, 1962).

A. vulgare vit dans de nombreux types d'habitats. Bien que son habitat de prédilection soit constitué par les collines sèches et calcaires de la région méditerranéenne, *A. vulgare* colonise aussi des milieux très anthropisés tels que les jardins et les cultures, les hangars, les maisons, les serres et les champignonnières (Vandel, 1962) et même les cimetières où il attaque les cadavres (Motter, 1898). Cependant, cette espèce colonise avant tout des milieux ouverts de type prairial et est absente des milieux forestiers (obs. pers.). En France, il ne s'aventure pas au-delà de 1500m d'altitude (Vandel, 1962) mais il s'aventure plus haut dans les régions plus chaudes, par exemple jusqu'à 2500m dans l'Atlas marocain (Paulian de Félice, 1939) et 2000 m dans la Sierra Nevada (Vandel, 1953).

Du fait de ses caractéristiques écologiques et de son comportement anthropophile, *A. vulgare* est devenu une espèce invasive accomplie, capable de disperser sur de grandes distances grâce à l'homme (Garthwaite *et al.*, 1995). Originaire du sud de l'Europe (Vandel, 1962), *A. vulgare* a colonisé les habitats terrestres de la plupart des régions tempérées et subtropicales de la planète : l'Europe et le pourtour méditerranéen (Garthwaite *et al.*, 1995; Sars, 1899; Vandel, 1962), l'Arabie (Taiti & Ferrara, 1991), la plus grande partie de l'Amérique du Sud et du Nord (Garthwaite *et al.*, 1995; Mulaik, 1960; Van Name, 1936; Van Name, 1942), l'Afrique du sud (Ferrara, 1979), l'Australie (Green, 1961), la Nouvelle Zélande (Chilton, 1901), le Japon et la Chine (Saito, 1986; Silvestri, 1927) ainsi que de nombreuses îles de l'Atlantique et du Pacifique (Ferrara, 1979; Garthwaite *et al.*, 1995; Van Name, 1942; Vandel, 1962).

2. Facteurs impliqués

Chromosomes sexuels: Chez *A. vulgare*, les mâles sont homogamétiques *ZZ* et les femelles hétérogamétiques *ZW* (Juchault & Legrand, 1972; Juchault & Legrand, 1989; Legrand *et al.*, 1987).

***Wolbachia*:** La présence de bactéries intra-cytoplasmiques féminisantes a été mise en évidence par Martin *et al.* (1973) mais elles n'ont été clairement identifiées comme *Wolbachia* que bien plus tard (Bouchon *et al.*, 1998; Rousset *et al.*, 1992). *Wolbachia* induit un

phénotype femelle chez les mâles génétiques. Une des conséquences est la production de portée à sexe-ratio biaisée en faveur des femelles. Parfois, *Wolbachia* peut également induire l'apparition du phénotype intersexué mâle ou femelle lors de croisements menés au laboratoire (en présence du gène masculinisant ou non, voir plus bas ; Rigaud & Juchault, 1993).

Elément *f*: il s'agit d'un facteur génétique qui inverse les mâles génétiques en femelles fonctionnelles. L'élément *f* semble être un fragment du génome de *Wolbachia* inséré de manière instable dans le génome d'*A. vulgare* (Juchault & Mocquart, 1993; Legrand & Juchault, 1984). Contrairement aux femelles infectées par *Wolbachia*, les femelles porteuses de *f* sont sensibles à l'injection d'hormone androgène qui entraîne l'apparition de caractères sexuels mâles chez ces dernières (Juchault & Legrand, 1981b). Le taux de transmission de l'élément *f* est instable au cours des générations, mais il diminue aussi au fur et à mesure des évènements de reproduction (allélogénie). Cependant, des croisements réalisés par Juchault & Mocquard (1993) suggère que l'élément *f* peut être intégré de manière stable sur le chromosome *Z* pour donner un néo-chromosome *W* qui se comporte comme le chromosome *W*.

Gène masculinisant *M*: Un gène autosomal dominant masculinisant appelé '*M*' a été mis en évidence chez *A. vulgare* par des croisements (Juchault & Legrand, 1976; Rigaud & Juchault, 1993). Ce gène induit le phénotype mâle d'individus *WZ* en inhibant le déterminant du sexe femelle situé sur le chromosome *W*. *M* est également capable de restaurer le phénotype mâle en présence de *f*. Par contre *M* n'est pas capable d'inhiber l'effet féminisant de *Wolbachia*. Il semble toutefois capable de retarder légèrement l'expression de *Wolbachia* en induisant la production de phénotypes intersexués. La plupart de ces intersexués sont des femelles fonctionnelles (intersexués femelles, iF) qui peuvent transmettre le gène *M* à leur descendance. Les individus masculinisés possédant *f* ou le chromosome *W* sont des mâles fonctionnels qui peuvent présenter ou non des ouvertures génitales femelles (♂og).

Résistance à la transmission de *Wolbachia*: un système polygénique contrôlant la transmission de *Wolbachia* à la descendance a été mis en évidence par des croisements (Rigaud & Juchault, 1992). Ce système polygénique ne constitue pas à proprement parler un facteur sexuel car il n'a pas d'impact direct sur le phénotype sexuel d'un individu. Il joue cependant un rôle important dans l'évolution des facteurs sexuels d'une population puisqu'il limite le taux de transmission de *Wolbachia*. Il affecte donc la sexe-ratio de la descendance et la vitesse de propagation de *Wolbachia* dans les populations naturelles.

Virus masculinisant: Un virus semble capable de modifier les caractères sexuels secondaires d'*A. vulgare*. En effet, sa présence a été corrélée avec des phénomènes d'intersexualité apparente chez *Porcelio dilatatus* et *A. vulgare* (Juchault *et al.*, 1991). Ce virus nommé OMV (Oniscoid Masculinizing Virus) semble responsable de pseudohermaphroditisme mâle externe, c'est-à-dire d'une différenciation de caractères sexuels externes mâles, parfois sous forme de mosaïque. Cependant, les organes internes tels que les gonades ne sont pas affectés. L'intersexualité peut être transmise maternellement et paternellement et la différenciation des caractères mâles est inhibée lorsque la reproduction a lieu à une température de 27°C. Ce virus est rare chez *A. vulgare* et n'est donc cité ici qu'à titre anecdotique.

3. Répartition dans les populations naturelles

La distribution et le polymorphisme des facteurs sexuels ont été étudiés au laboratoire depuis de nombreuses années. Une quantité relativement importante de données est disponible dans la littérature (Grandjean *et al.*, 1993; Juchault *et al.*, 1980; Juchault & Legrand, 1981a; Juchault & Legrand, 1981b; Juchault *et al.*, 1992; Juchault *et al.*, 1993; Juchault *et al.*, 1994; Rigaud *et al.*, 1999). Les populations naturelles présentent une grande variabilité aussi bien dans la répartition des facteurs sexuels que dans la sexe-ratio (Juchault *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999). La plupart des populations contient soit l'élément *f* soit *Wolbachia* soit les deux facteurs. Cependant, *f* est de loin le facteur le plus répandu puisqu'il est présent dans 93% des populations analysées par Juchault *et al.* (1993). Les populations comprenant uniquement des femelles génétiques sont rares (3% des populations). La plupart des populations comprennent des femelles génétiques et des femelles porteuses de *f.* Plus rarement, on observe uniquement des femelles porteuses de *f* (17% des populations) ou des femelles porteuses de *f* avec des femelles infectées par *Wolbachia* (17% des populations).

Les faibles prévalences de *Wolbachia* observées entrent en contradiction avec les modèles théoriques les plus simples (Bull, 1983; Hatcher, 2000; Taylor, 1990). En effet, en l'absence de gènes de résistance à la transmission ou à la féminisation, *Wolbachia* devrait atteindre une prévalence égale à son taux de transmission. On devrait donc s'attendre à des prévalences de 80-90% dans la nature, or ces prévalences ne sont jamais atteintes. Cependant, Rigaud *et al.* (1992) ont montré que même en l'absence de gènes de résistance, les facteurs féminisants ne sont pas toujours capables d'envahir des populations de petite taille et ne comprenant initialement que des mâles et des femelles génétiques. Dans la majorité des populations artificielles qu'ils ont recréées au laboratoire, *Wolbachia* diminue rapidement en

fréquence. *f* semble par contre posséder un pouvoir invasif supérieur à *Wolbachia,* malgré un taux de transmission plus faible. La probabilité de disparition à l'équilibre d'un facteur féminisant dépend du nombre de femelles porteuses de ce facteur et du taux de transmission de celui-ci. Hatcher *et al.* (1999) montrent que même dans de grandes populations, les facteurs féminisants peuvent disparaître par stochasticité (taux de transmission et probabilité de reproduction variables) si le nombre de mâles dans la population est insuffisant pour féconder toutes les femelles.

Il a également été proposé que la sélection sexuelle opérée par les mâles pouvait jouer un rôle dans le maintien du polymorphisme d'infection (Hatcher, 2000; Randerson *et al.*, 2000). En effet, si les mâles sont capables de distinguer les femelles infectées des femelles non-infectées, ils peuvent s'accoupler préférentiellement avec l'une ou l'autre des catégories et ainsi permettre le maintien d'un polymorphisme dans la population. Des expériences de choix multiples réalisées en conditions artificielles ont montré que les mâles s'accouplent préférentiellement avec les femelles génétiques non-infectées par *Wolbachia* (Moreau *et al.*, 2001). Ils investissent également une quantité plus importante de sperme lors des accouplements avec les femelles génétiques. De nombreux accouplements des mâles sur un laps de temps réduit se traduisent par une réduction de la fertilité des femelles infectées, due à une réduction de la quantité de spermatozoïdes inséminés lors de l'accouplement (Rigaud & Moreau, 2004). Une telle réduction de fertilité n'a pas été observée chez les femelles non-infectées. Dans une population dont la sexe-ratio est fortement biaisée en faveur des femelles, les femelles infectées par *Wolbachia* seraient donc défavorisées. Il reste cependant à définir quel est l'impact de cette préférence sexuelle dans les populations naturelles.

D'autres auteurs ont construit des modèles incorporant d'autres facteurs génétiques tels que des gènes de résistance chez l'hôte pour expliquer les prévalences observées de *Wolbachia.* En effet, la présence de facteurs féminisants induit une sexe-ratio biaisée dans les populations. On peut alors s'attendre à ce que des gènes de résistance à ces facteurs féminisants soient favorisés par sélection fisherienne (Fisher, 1930). De tels gènes de résistance ont été mis en évidence chez *A. vulgare* (voir plus haut ; Rigaud & Juchault, 1992; Rigaud & Juchault, 1993). Cependant, l'effet de ces gènes de résistance sur la fréquence du facteur féminisant dépend de son mode d'action. Un gène bloquant la transmission du facteur féminisant (ici '*r*' limite la transmission verticale de *Wolbachia)* limite efficacement la prévalence de ce facteur. Par contre, un gène qui restaure le phénotype mâle en présence d'un facteur féminisant sans empêcher sa transmission à la descendance (ici *'M'* restaure la fonction mâle en présence de *f*)

ne limite pas la fréquence de celui-ci dans la population (Caubet *et al.*, 2000). Au contraire, le gène de résistance peut favoriser la propagation du facteur féminisant *f* dans la population en permettant une transmission paternelle de ce facteur (Juchault *et al.*, 1992).

La structuration des populations peut également jouer un rôle dans le maintien du polymorphisme d'infection. Théoriquement, si les mâles ne peuvent féconder qu'un nombre limité de femelles, la valeur sélective des femelles dépend du nombre de mâles présents dans la population. Si la population possède un nombre beaucoup plus élevé de femelles que de mâles, ces derniers peuvent ne pas être capables de féconder toutes les femelles. Dans une telle situation, les populations infectées présentent un taux de croissance plus faible et un risque d'extinction plus élevé que les populations non-infectées. Des populations structurées présentent donc une prévalence globale plus faible qu'une population non structurée. Une telle dynamique n'a été démontrée que de manière théorique (Hatcher *et al.*, 1999; Hatcher, 2000; Hatcher *et al.*, 2000) mais des phénomènes similaires ont été observés dans d'autres modèles de conflits génomiques liés au déterminisme du sexe, tels que la gynodioécie (McCauley & Taylor, 1997; McCauley *et al.*, 2000; Pannell, 1997). Cependant, les femelles *A. vulgare* n'entrent pas toutes en reproduction en même temps et semblent capables de ralentir le rythme de développement des ovocytes en fonction de la disponibilité des mâles ("male-effect" ; Lefebvre & Caubet, 1999; Lefebvre, 2002). De plus, les mâles présentent de grandes capacités de reproduction (Moreau & Rigaud, 2003), même si la fertilité des femelles est affectée par des accouplements trop fréquents des mâles (Rigaud & Moreau, 2004). Il n'est donc pas évident qu'une forte infection par *Wolbachia* ait un impact très négatif sur la dynamique des populations de son hôte. Dans le cas de la gynodioécie, une autre étude théorique a montré qu'une dynamique de type métapopulation, avec des flux de gènes limités, peut au contraire favoriser des fréquences plus élevées de femelles que dans le cas d'une population panmictique (Couvet *et al.*, 1998). Dans ce cas, le taux de croissance des sous-populations est d'autant plus élevé que la fréquence des femelles y est élevée. Les populations présentant une forte proportion de femelles contribueront davantage au pool de migrants que les populations composées majoritairement d'hermaphodites et la sélection de groupe favorise donc les femelles.

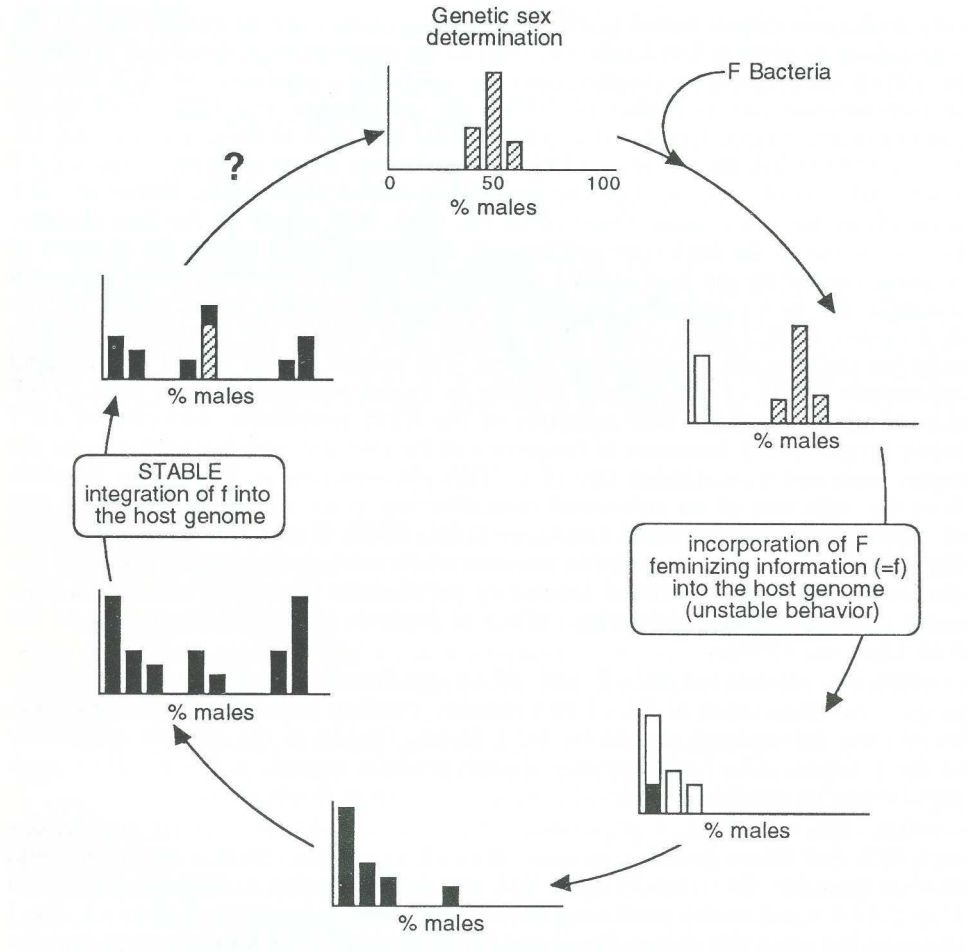


Figure I-3 Modèle proposé par Juchault *et al.* (1993) expliquant l'évolution des déterminants sexuels femelles dans les populations d'*A. vulgare*. ? indique une évolution hypothétique du déterminisme parasite vers un déterminisme génétique chromosomique. Les histogrammes représentent la répartition des différents types de descendances en fonction de la sexe-ratio. Blanc : femelles infectées par *Wolbachia*, hachuré : descendances de femelles génétiques *ZW*, noir : femelles porteuses de *f* (d'après Juchault *et al.*, 1993)

L'analyse de la répartition des différents types de femelles et la prise en compte des premiers modèles théoriques (Bull, 1983; Taylor, 1990) ont amené Juchault *et al.* (1993) à proposer un modèle d'évolution cyclique du déterminisme du sexe chez *A. vulgare* (Figure I-3). Initialement, une population est composée de femelles génétiques *WZ*. L'introduction de *Wolbachia* induit la disparition des femelles génétiques *WZ* et d'une sexe-ratio biaisée. Il faut cependant remarquer qu'aucune population ne comprenant que des femelles à *Wolbachia* n'a encore été observée. 'L'information' féminisante contenue dans le génome de *Wolbachia* serait ensuite intégrée de manière instable dans celui de l'hôte sous la forme de l'élément *f* conduisant à la cohabitation de *f* et de *Wolbachia* dans la population. Rigaud & Juchault (1992) proposent que la capacité d'*A. vulgare* à contrôler le taux de transmission de *Wolbachia* pouvait défavoriser la propagation de *Wolbachia* dans la population. La production rapide de l'élément *f* et l'action conjointe du gène masculinisant (qui permet une

transmission paternelle de l'élément *f* ;Rigaud & Juchault, 1993) permettraient la propagation de l'élément *f* dans la population au dépens de *Wolbachia* malgré le plus fort taux de transmission de *Wolbachia* (Grandjean *et al.*, 1993). Le suivi de la population de Niort, dans l'ouest de la France, a montré que l'élément *f* a augmenté régulièrement en fréquence sur une période de 23 ans, remplaçant progressivement *Wolbachia* (Juchault *et al.*, 1992).

Le passage d'une population comprenant uniquement des femelles porteuses de *f* à une population mixte comprenant également des femelles génétiques est possible par l'intégration stable de *f* dans le génome de l'hôte qui donne alors naissance à un néo-chromosome sexuel *W** (Juchault & Mocquart, 1993). Les deux types de femelles peuvent se maintenir dans la même population si la fréquence d'apparition de *W** est suffisamment élevée. D'après ce modèle la structuration des populations naturelles n'est donc que transitoire et évolue de manière cyclique au cours du temps.

4. Histoire évolutive de *Wolbachia* chez *A. vulgare*

Le séquençage du gène *wsp* a récemment permis de mettre en évidence l'existence de deux souches de *Wolbachia*, nommées *w*VulC et *w*VulM, chez *A. vulgare* (Cordaux *et al.*, 2004). *w*VulC est plus largement répandue que *w*VulM puisque sur 20 populations échantillonnées par Cordaux *et al.* (2004), douze sont infectées par *w*VulC et quatre par *w*VulM. A notre connaissance, aucun cas d'infection multiple n'a été reporté dans la littérature.

La forte divergence observée entre les deux souches sur le gène *wsp* (5,3%) ne montre aucune congruence avec la phylogénie des mitotypes auxquels elles sont associées et chaque type bactérien a été observé avec plusieurs lignées mitochondriales. *w*VulC a été trouvée associée aux quatre lignées mitochondriales connues chez *A. vulgare* (AvI à AvIV), alors que *w*VulM n'a été trouvée associée qu'à deux des lignées mitochondriales (AvI et AvIII). Un tel patron est incompatible avec une stricte coévolution hôte-parasite et suggère que les deux types bactériens ont été acquis indépendamment par des transferts horizontaux. Rigaud et Juchault (1995) ont montré que de tels transferts peuvent avoir lieu par simple contact de l'hémolymphe entre deux individus blessés. De plus des transferts horizontaux par la voie du parasitisme (acariens phorétiques, mouches parasitoïdes de la famille *Rhinophoridae*) semblent également possibles chez les isopodes (Cordaux *et al.*, 2001).

Des inoculations artificielles de *Wolbachia* ont montré que *w*VulC (Rigaud *et al.*, 2001) et *w*VulM (Cordaux *et al.*, 2004) sont des bactéries féminisantes et possèdent toutes deux une forte pénétrance (c'est-à-dire une forte capacité à féminiser leur hôte). Cependant,

*w*VulC présente un taux de transmission à la descendance plus élevé que *w*VulM (respectivement 82% et 73%) suggérant une plus faible compétitivité de *w*VulM (Cordaux *et al.*, 2004). *w*VulC semble présenter une large capacité d'adaptation à de nouveaux hôtes (Rigaud & Juchault, 1995) et un plus fort taux de transmission. Cordaux *et al.* (2004) ont donc proposé que *w*VulC soit un envahisseur dans les populations d'*A. vulgare* au détriment de *w*VulM qui serait une souche résidente.

D. *Génétique des populations de l'hôte* A. vulgare

La structuration génétique des populations d'*A. vulgare* a été relativement peu étudiée. En effet, jusqu'à présent seuls le polymorphisme enzymatique et le polymorphisme de l'ADN mitochondrial ont été analysés à des échelles géographiques diverses.

1. ADN nucléaire

La principale étude du polymorphisme enzymatique a été menée par Garthwaite *et al.* (1995). Ils ont échantillonné un grand nombre de populations à travers l'Europe et l'Amérique du nord. La plupart du polymorphisme enzymatique était intra-population. Ils ont montré l'existence d'une structuration géographique plus forte en Europe qu'en Amérique du Nord. Ils ont également mis en évidence la perte de diversité génétique consécutive au processus d'invasion récent du continent nord-américain (d'est en ouest). Plusieurs corrélations existent entre la latitude et la fréquence de certains allèles enzymatiques. Elles peuvent être expliquées aussi bien par l'historique de l'invasion du continent nord-américain (facilitée par l'homme) que par des phénomènes de sélection liés aux conditions climatiques et environnementales. Cependant à cause de l'échelle géographique utilisée, cette étude n'apporte pas vraiment d'informations sur les capacités de dispersion d'*A. vulgare*, ni sur le type de structuration génétique (isolement par la distance, modèle en île, etc.). Une autre étude s'est intéressée au polymorphisme de cinq populations européennes et nord africaines et indique des résultats comparables (Raimond, 1988). Deux autres études (Beck & Price, 1981; Beck & Price, 1985) ont montré une structuration génétique significative à une échelle géographique réduite. Cependant, les auteurs ne mentionnent pas clairement l'échelle géographique de leur échantillonnage et elles n'ont donc qu'un intérêt limité. De plus, Garthwaite *et al.* (1995) ont suggéré que l'échantillonnage de Beck & Price (1981) contenait un mélange d'*A. vulgare* et d'*A. nasatum*.

2. ADN mitochondrial

Les études sur le polymorphisme mitochondrial s'intéressent d'avantage aux effets des facteurs féminisants *f* et *Wolbachia* sur le polymorphisme mitochondrial (Cordaux *et al.*, 2004; Grandjean *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999; Souty-Grosset *et al.*, 1992). Ces études indiquent que les populations ne comprennent généralement qu'un nombre restreint de mitotypes. Cependant, le polymorphisme au sein des populations est plus important que celui habituellement observé chez d'autres espèces infectées par *Wolbachia.* Rigaud *et al.* (1999) expliquent l'existence de ce polymorphisme par une propagation incomplète de *Wolbachia* et une transmission partiellement paternelle de *f.* Un fort déséquilibre d'association est observé entre l'infection par *Wolbachia* et l'ADN mitochondrial à une échelle géographique régionale (Rigaud *et al.*, 1999). Cependant, ce déséquilibre d'association disparaît si l'on poole des populations géographiquement très éloignées ensemble (Cordaux *et al.*, 2004). Par contre l'élément *f* ne présente pas de déséquilibre d'association particulier avec l'ADN mitochondrial puisqu'il a été trouvé en association avec de nombreux mitotypes différents, y compris ceux associés à *Wolbachia* (Grandjean *et al.*, 1993).

La divergence entre mitotypes est variable d'une population à l'autre et il n'existe pas de corrélation entre la divergence génétique des mitotypes et la distance géographique les séparant. La structuration génétique des populations ne suit pas un modèle d'isolement par la distance. De plus un même mitotype peut être observé dans des populations très distantes géographiquement, suggérant de grandes capacités de dispersion *d'A. vulgare*. Un tel patron de structuration est compatible avec l'idée que le transport accidentel par l'homme (par exemple dans du terreau, des pots de fleurs, etc.) permet une dispersion de cette espèce sur de grandes distances. Cependant, d'autres hypothèses pouvant expliquer le patron de structuration génétique observé, n'ont pas pu être exclues, notamment de faibles capacités de dispersion des femelles ou des événements de goulots d'étranglement démographiques. Des études comportementales en conditions artificielles ont montré au laboratoire que les mâles sont plus actifs et explorent davantage leur environnement que les femelles et on s'attend donc à ce qu'ils dispersent plus que les femelles (Caubet, données non publiées). Les femelles infectées (mâles génétiques féminisés par *Wolbachia)* ont un comportement intermédiaire entre les mâles et les femelles génétiques. Cependant, une étude réalisée en condition semi-naturelle n'a pas permis de montrer de différences significatives dans le comportement de dispersion entre les mâles, les femelles non-infectées et les femelles infectées par l'une ou l'autre des souches connues de *Wolbachia* (Verne *et al.* données non publiées).

II. Considérations statistiques préliminaires

A. Tests de biais de sexe-ratio

Afin de tester les proportions de mâles observées dans les échantillons récoltés et la proportion attendue avec une proportion des mâles équilibrée (autant de mâles que de femelles), des tests G d'ajustement multiples ont été appliqués (Sokal & F.J., 1995). Il s'agit d'un test équivalent au test χ^2, mais qui qui est plus simple à calculer et d'être plus précis que ce dernier (additivité partielle des valeurs χ^2). La statistique G est calculée ainsi :

$$G = 2\sum^{a} f_i \ln\left(\frac{f_i}{\hat{f}_i}\right)$$

Cette valeur est comparée à une table de χ^2 avec (a – 1 – nb paramètres estimés) degrés de liberté. Les tests ont été calculés de façon à tester successivement 3 hypothèses :

- les échantillons présentent-ils des fréquences homogènes entre eux ?

  $$G_H = \sum^{a,b} f \ln(f) - \sum^{a}\left(\sum^{b} f\right)\ln\left(\sum^{b} f\right) - \sum^{b}\left(\sum^{a} f\right)\ln\left(\sum^{a} f\right) + n\ln(n)$$

  a = nombre de catégories ; b = nombre d'échantillons ; n = effectif total

  La valeur G_H est comparée à la distribution de χ^2 avec (a – 1)(b – 1) degrés de liberté.

- les échantillons, pris comme un tout, présentent-ils une différence par rapport à la distribution attendue ?

  $$G_P = 2\sum^{a} f_i \ln\left(\frac{f_i}{\hat{f}_i}\right)$$

  Cette valeur est comparée à une table de χ^2 avec (a – 1 – nb paramètres estimés) degrés de liberté

- l'ensemble du jeu de données s'écarte-t-il de la distribution attendue ? (effets conjoints des deux hypothèses précédentes).

  $G_T = G_P + G_H$

  Cette valeur est comparée à une table de χ^2 avec $b(a – 1)$ degrés de liberté.

Enfin, un test simple est effectué sur chaque échantillon individuellement pour identifier les éventuels échantillons qui s'écartent de la distribution attendue.

B. Variabilité génétique intra-population

Il existe un grand nombre de méthodes pour mesurer la diversité génétique à l'intérieur d'une population. Je m'attacherai à présenter tout d'abord les estimateurs utilisés sur les loci microsatellites, puis ceux utilisés sur les séquences mitochondriales.

1. Polymorphisme des loci microsatellites

a) Diversité allélique

La diversité allélique correspond au nombre moyen d'allèles par locus. Cependant, cet estimateur est étroitement lié à la taille de l'échantillon, car plus le nombre d'individus génotypés est grand, plus le nombre d'allèles observés sera grand. La comparaison directe de la diversité allélique entre des échantillons de tailles différentes est donc difficile. L'utilisation de méthodes de raréfaction permet de résoudre ce problème. Le principe est d'estimer la diversité génétique attendue dans chaque échantillon, s'ils avaient une taille de *g* gènes, avec *g* plus petit ou égal à la taille du plus petit échantillon. La diversité allélique corrigée par raréfaction, a été estimée à l'aide du logiciel HP-Rare (Kalinowski, 2004; Kalinowski, 2005).

b) Hétérozygotie *H*

L'hétérozygotie peut être définie de deux façons différentes :

- **l'hétérozygotie observée** H_O correspond à la fréquence des individus hétérozygotes observée dans l'échantillon.
- **l'hétérozygotie attendue** H_E sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg. Elle peut être calculée de la façon suivante :

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$$

où p_i est la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle au locus considéré.

Dans le cas d'échantillons de petite taille, Nei (1978) a proposé un estimateur non-biaisé de l'hétérozygotie attendue $H_{n.b.}$ calculé de la façon suivante :

$$H_{n.b.} = \frac{2N}{2N-1}(1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2)$$

où *N* correspond au nombre d'individu de l'échantillon.

2. Polymorphisme de séquence

a) Diversité génique :

La diversité génique, aussi appelée diversité haplotypique ou diversité allélique, est l'équivalent de l'hétérozygotie attendue pour des données diploïdes. C'est la probabilité que deux haplotypes tirés au hasard dans un échantillon soient différents (Nei, 1987).

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1}(1 - \sum_{i=1}^{k} p_i{}^2)$$

n : nombre de séquences de l'échantillon

k : nombre d'haplotypes différents

p_i : fréquence de l'haplotype i dans l'échantillon

Cet estimateur est équivalent à l'hétérozygotie attendue calculée sur les loci microsatellites.

b) Estimateur de Tajima :

C'est le nombre moyen de différences par paire de séquences (Tajima, 1983; Tajima, 1993):

$$\hat{\pi} = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}$$

$\hat{d}_{ij}$ une estimation du nombre de mutations apparues depuis la divergence des haplotypes i et j

k le nombre d'haplotypes, p_i la fréquence de l'haplotype j

c) Diversité nucléotidique :

Cet estimateur est l'équivalent de l'estimateur de Tajima au niveau nucléotidique. C'est la probabilité que deux nucléotides homologues choisis au hasard soient différents (Nei, 1987; Tajima, 1983).

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^{k} \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

$\hat{d}_{ij}$ une estimation du nombre de mutations apparues depuis la divergence des haplotypes i et j

k le nombre d'haplotypes, p_i la fréquence de l'haplotype j

L : nombre de loci, c. à d. longueur des séquences analysées

d) Estimateurs de θ :

Il existe plusieurs façons d'estimer la valeur du paramètre $\theta = 2Mu$, avec M égal à la taille efficace N_e pour les populations haploïdes et à $2N_e$ pour les populations diploïdes ; u est le taux de mutation par génération et par site nucléotidique. Ces différents estimateurs tendent tous vers la même valeur à l'équilibre sous un modèle neutre à sites infinis, mais divergeront

si les conditions de neutralité ne sont pas respectées. Leur comparaison permettra de tester la neutralité d'un jeu de données. Etablir une liste exhaustive de tous les estimateurs de θ n'aurait pas de sens, aussi je ne vais présenter que les estimateurs utilisés au cours de la thèse.

L'estimateur de Waterson $\hat{\theta}_\pi$ est estimé à partir de la relation qui existe à l'équilibre entre θ et l'espérance du nombre moyen de différences par paire $\hat{\pi}$, dans le modèle à sites infinis (Tajima, 1983) :

$$\theta = E(\hat{\pi})$$

L'estimateur de Tajima θ_S est basé sur une autre relation à l'équilibre du modèle à sites infinis. A l'équilibre, θ est lié au nombre de sites ségrégeants S et à la taille de l'échantillon n par la relation suivante (Tajima, 1989) :

$$\theta_S = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}}$$

L'estimateur de Ewens $\hat{\theta}_k$ est estimé à partir de la relation qui existe entre le nombre d'haplotypes attendu k selon θ et la taille de l'échantillon n (Ewens, 1972) :

$$E(k) = \theta \sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{\theta + 1}$$

3. Tests de recombinaison

Une recombinaison est un échange de matériel génétique entre deux séquences nucléotidiques. Un grand nombre de méthodes statistiques permet aujourd'hui de détecter des évènements de recombinaisons entre séquences nucléotidiques (Posada & Crandall, 2001; Posada, 2002). Ces méthodes peuvent être classées en 4 grandes catégories :

- les **méthodes de distance** étudient les inversions de distances génétiques entre séquences. Elles utilisent en général une fenêtre coulissante et des estimateurs statistiques de distances génétiques entre séquences (Weiller, 1998).
- les **méthodes phylogénétiques** sont basées sur les incongruences entre les phylogénies de différentes régions du génome. Si des phylogénies basées sur des régions adjacentes du génome donnent des arbres de topologie différente, on peut suspecter des évènements de recombinaison. Ce sont les méthodes les plus fréquemment utilisées dans la littérature (Grassly & Holmes, 1997; Hein, 1990; Hein, 1993; Holmes *et al.*, 1999; Lole *et al.*, 1999; Martin & Rybicki, 2000).

- les **méthodes de compatibilité** analysent site par site la répartition des incongruences phylogénétiques le long des séquences. Ces méthodes ne requièrent pas de connaître la phylogénie des séquences (Jakobsen & Easteal, 1996; Jakobsen *et al.*, 1997).
- les **méthodes de distribution des substitutions** examinent le regroupement des substitutions nucléotidiques selon une distribution statistique attendue (DuBose *et al.*, 1988; Maynard Smith, 1992; Maynard Smith & Smith, 1998; Sawyer, 1989; Sneath, 1995; Stephens, 1985; Takahata, 1994; Worobey, 2001).

Les puissances de détection des différentes méthodes dépendent du polymorphisme du jeu de données analysé (diversité génétique, nombre de recombinaisons, divergence des séquences, etc.) et aucune n'est vraiment plus performante que les autres. Il est donc préférable d'utiliser simultanément plusieurs méthodes pour augmenter la puissance de détection, tout en limitant le nombre de faux positifs (Posada & Crandall, 2001; Posada, 2002). J'ai utilisé simultanément cinq méthodes distinctes pour analyser les évènements de recombinaison chez *Wolbachia pipientis*.

a) RDP (2000)

Il s'agit d'une méthode phylogénétique. Dans un premier temps, tous les sites non informatifs d'un point de vue phylogénétique sont exclus. Dans tout groupe de trois séquences, deux séquences A et B sont plus ressemblantes que la troisième séquence C. Une séquence de référence va donc être choisie en fonction des positions relatives des trois séquences à analyser sur un dendrogramme UPGMA. Une fenêtre coulissante compare ensuite le pourcentage d'identités entre chaque paire de séquences. Sont identifiées comme recombinantes les régions qui présentent plus de ressemblance entre les séquences A et C ou B et C qu'entre les séquences A et B. Enfin, la probabilité que la région identifiée comme recombinante soit apparue par hasard est estimée à l'aide d'une loi binominale.

Pour identifier les séquences parentes et filles, un arbre est construit à partir de l'alignement complet par la méthode Neighbor-joining. Les séquences ancestrales à chaque nœud sont ensuite calculées par parcimonie. On calcule le nombre le plus grand de substitutions entre les nœuds internes de l'arbre, de l'ancêtre commun le plus récent d'un triplet de séquences à l'extrémité des branches de ce triplet. La branche qui présente le plus grand nombre de substitutions dans la région recombinée par rapport aux autres branches est considérée comme celle où a eu lieu la recombinaison et permet d'identifier la séquence fille.

b) Bootscanning (Salminen *et al.*, 1995)

C'est une méthode phylogénétique également base sur le principe d'une fenêtre coulissante qui se déplace le long de l'alignement. La méthode implantée dans RDP est légèrement différente de la méthode originale dans le sens où elle ne nécessite pas d'identifier des séquences de référence et les analyses sont effectuées pour chaque triplet de séquences. A chaque position prise par la fenêtre coulissante, les distances génétiques entre séquences sont calculées. Chaque position de la fenêtre est ensuite répliquée par bootstrap. L'analyse des regroupements de séquences observés aux différentes positions de la fenêtre permet d'identifier les séquences recombinantes. Pour une séquence donnée, si toutes les positions de la fenêtre sont associées avec la même séquence de référence (avec plus de 70% de support des valeurs bootstrap), alors elle n'est pas recombinante, mais si les différentes positions sont successivement associées à deux séquences de référence différentes, alors elle a une origine recombinante. Finalement, la probabilité que les régions identifiées comme recombinantes soient apparues par hasard est estimée à l'aide d'une loi binominale ou d'une loi χ^2. Les séquences mères et filles sont identifiées comme dans la méthode RDP.

c) Chimaera (Maynard Smith, 1992; Posada & Crandall, 2001)

Chimaera (Posada & Crandall, 2001) est une modification de la méthode maximum χ^2 développée par Maynard Smith (1992). Il s'agit d'une méthode qui analyse la distribution des substitutions entre trois séquences. Les principales différences concernent la manière dont sont choisis les sites polymorphes et le fait que Chimaera ne permet d'analyser que trois séquences à la fois. Chaque séquence d'un triplet est examinée pour savoir si elle peut être issue de la recombinaison des deux autres.

Après élimination des sites non informatifs (monomorphes ou différents pour les trois séquences), les données de séquence sont compressées sous forme d'une série de 1 et de 0. Les 1 représentent une identité entre la première et la deuxième séquence et les 0 les identités entre la première et la troisième séquence. Une fenêtre coulissante, partitionnée en deux parties égales va ensuite analyser position par position, la répartition des 0 et des 1 le long de la série. A chaque pas de déplacement, une valeur χ^2 de 2×2 est calculée comme la différence de proportion de 1 et de 0 dans chaque moitié de la fenêtre coulissante. Lorsque l'on représente l'évolution des valeurs χ^2 le long de la série, un pic de ces valeurs indique un point de recombinaison. La significativité des valeurs χ^2 est ensuite testée par un test sur permutations.

Pour identifier les régions recombinantes, une fenêtre est centrée sur une valeur pic de χ^2. La taille de la fenêtre est progressivement augmentée jusqu'à ce que la valeur χ^2 diminue (ce qui signifie que la fenêtre a atteint une taille supérieure à celle de la région recombinée, la valeur maximum de χ^2 est atteinte lorsque la moitié de la fenêtre correspond à la région recombinée). Les valeurs χ^2 situées à chaque extrémité de cette fenêtre et calculées précédemment avec la fenêtre coulissante sont ensuite comparées pour déterminer de quel côté se trouve la région recombinée (côté où se trouve la valeur χ^2 la plus forte).

d) SiScan (Gibbs *et al.*, 2000).

La méthode "Sister scanning" compare quatre séquences : trois séquences réelles et une quatrième qui peut être soit une séquence réelle (séquence externe la plus proche des trois autres sur l'arbre phylogénétique) soit une séquence simulée par une répartition au hasard des positions nucléotidiques d'une des trois autres séquences ("horizontal randomization"). Une fenêtre coulissante de taille fixe se déplace le long de l'alignement avec un pas de x nucléotides. Si la quatrième séquence est simulée, une nouvelle séquence est simulée à chaque position. Chaque colonne (site nucléotidique) de la fenêtre est classée parmi 15 catégories selon les ressemblances des 4 séquences puis les nucléotides de chaque colonne sont répartis aléatoirement dans la colonne ("vertical randomization") pour produire un nombre défini d'alignements aléatoires. Pour chaque alignement simulé, on calcule ensuite le nombre de colonnes dans chacune des 15 catégories. Finalement, un test Z est effectué à chaque position de la fenêtre coulissante pour déterminer si le nombre de colonnes placées dans chaque catégorie est significativement différent de ceux obtenus aléatoirement par les "vertical randomization".

e) DNAsp (Hudson & Kaplan, 1985; Rozas & Rozas, 1999)

La méthode implanté dans DNAsp v.3 (Rozas & Rozas, 1999) permet d'estimer le nombre minimum de recombinaisons nécessaires pour expliquer le jeu de données observées. Le test utilisé dans DNAsp est basé sur le modèle d'évolution neutre à sites infinis avec recombinaison. Sous ce modèle, les substitutions ont une fréquence infinitésimale. On s'attend donc à ce qu'il y ait au mieux une mutation sur chaque site nucléotidique. Si l'on considère 2 sites nucléotidiques, on peut donc observer au maximum quatre gamètes différents. Un test des "quatre gamètes" est utilisé pour détecter les points de cassure des recombinaisons. Dans le modèle à sites infinis, le taux de mutation par site est infinitésimal. Par conséquent, pour un site donné, on s'attend au maximum à une mutation (c. à d. pas de mutation réverse ou de mutation récurrente). La seule possibilité d'obtenir les quatre types de gamètes est donc la

recombinaison. En comparant un à un tous les sites du jeu de séquence à analyser, cette méthode permet de localiser les sites et le nombre des recombinaisons. Par contre, elle ne permet pas d'identifier les séquences parentes et filles.

4. Déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison, aussi appelé déséquilibre d'association définit l'association non aléatoire d'allèles situés sur des loci différents. Les tests déséquilibres de liaison entre loci microsatellites ont été testés par test exact de Fisher à l'aide du logiciel Genepop3.4 (Raymond & Rousset, 1995). L'hypothèse H_0 testée est ici est : les génotypes situés sur un locus sont indépendants des génotypes situés sur un deuxième locus. A partir des fréquences génotypiques observées, Genepop construit toutes les tables de contingence possibles pour chaque paire de loci. La probabilité du test est définie comme la somme des probabilités de toutes les tables (qui ont les mêmes valeurs marginales que la table observée), qui présentent une différence entre les échantillons aussi grande ou plus grande que celle de la table observée. Le nombre de tables de contingence possibles étant très élevé, une chaine de Markov est utilisée afin d'explorer efficacement l'espace de toutes les tables de contingence possibles qui ont les mêmes valeurs marginales que la table observée.

Pour les loci haploïdes (statut d'infection par *Wolbachia*/ADN mitochondrial), j'ai utilisé le logiciel Arlequin v. 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005) qui utilise de la même façon un test exact de Fisher. Cependant, ici, comme la phase gamétique est connue, le test est appliqué sur les fréquences alléliques.

C. Test de détection de goulots d'étranglement démographiques

Un goulot d'étranglement démographique, c'est-à-dire une forte réduction de la taille effective d'une population, va affecter le polymorphisme génétique en réduisant le nombre d'allèles et la diversité génique. Cependant la réduction du nombre d'allèles est plus rapide que celle de la diversité génique. En particulier le nombre d'allèles rares sera fortement réduit par un goulot d'étranglement. La conséquence sera un déficit d'allèles rares. Comme ces derniers contribuent peu à la diversité génique d'une population, il en résulte une diversité génique plus élevée que celle attendue pour le même nombre d'allèles et dans une population à l'équilibre mutation-dérive. Cette évolution de la diversité génique après un goulot d'étranglement n'a été démontrée que pour le modèle IAM (Infinite Allele Model ; Kimura & Crow, 1964; Maruyama & Fuerst, 1985). Si les loci évoluent selon un modèle SMM

(Stepwise Mutation Model ; Ota & Kimura, 1973), ils peuvent ne pas présenter d'excès de diversité génique sous certaines conditions, ce qui peut fortement réduire la puissance des tests (Cornuet & Luikart, 1996).

Afin de tester l'hypothèse d'un goulot d'étranglement, j'ai utilisé le logiciel Bottleneck (Cornuet & Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999). Dans un premier temps, le logiciel simule le processus de coalescence sous l'hypothèse d'équilibre dérive-mutation et selon un modèle de mutation défini, pour estimer la diversité génique attendue d'après le nombre d'allèles observés et la taille de l'échantillon. Trois modèles de mutation ont été testés: IAM, SMM et TPM (Two Phased Model ; Di rienzo *et al.*, 1994; Valdes *et al.*, 1993) avec les paramètres suivants : 95% de mutations "simple pas" et 5% de mutations "pas multiples" ; variance = 12 comme conseillé par (Piry *et al.*, 1999). 10000 itérations ont été réalisées. Deux tests statistiques sont appliqués pour comparer les diversités géniques observée et attendue de chaque locus : le test des signes et le test de Wilcoxon pour échantillons appariés bien que le premier manque de puissance statistique. Le second test est par contre très puissant, même lorsque le nombre d'individus et de loci analysés sont relativement faibles (Piry *et al.*, 1999).

D. Tests de neutralité

Le patron de polymorphisme d'une population peut être affecté par plusieurs facteurs, tels que sélection, dérive génétique et mutation. Il existe un nombre de plus en plus important de tests statistiques permettant de savoir si le polymorphisme moléculaire observé (séquences, RFLP) est compatible avec un modèle d'évolution neutre. L'hypothèse H_0 de ces tests est que toutes les mutations de la région considérée du génome sont neutres. On peut distinguer les tests mutationnels qui ne prennent en compte que les fréquences des mutations, des tests haplotypiques qui vont considérer à la fois les fréquences des mutations et leur structuration en haplotypes. Les tests mutationnels sont basés sur la comparaison d'estimateurs différents de θ qui tendent vers la même valeur sous un modèle d'évolution neutraliste, mais divergent si une des hypothèses du modèle est violée (sélection, goulot d'étranglement et/ou expansion démographique…). Les tests étant basés sur des estimateurs différents, ils ne présentent pas la même puissance de détection selon l'hypothèse testée. Par exemple, le test de Fu est de loin le test le plus performant pour détecter un auto-stop génétique sans recombinaison ou une expansion démographique, mais est moins performant que le test de Fu & Li pour détecter une sélection purifiante (Fu, 1997). Par conséquent, il peut être judicieux de comparer les résultats de différents tests pour déterminer le type de déviation par rapport au modèle de

neutralité. J'ai donc utilisé trois tests de neutralité différents : le test de Tajima (Tajima, 1989), le test de Fu & Li (Fu & Li, 1993) et le test de Fu (Fu, 1997).

1. Test de Tajima

Ce test est basé sur la comparaison de l'estimateur de Tajima θ_S basé sur le nombre de sites ségrégeants S et la diversité nucléotidique $\hat{\pi}_n$ dans un échantillon aléatoire de n séquences d'une même population. Sous un modèle neutraliste, $\hat{\pi}_n$ et $\hat{\theta}_S$ convergent vers $\hat{\theta} = 4Nu$. S ne prend pas en compte la fréquence des mutations observées dans l'échantillon, mais est fortement affecté par l'accumulation de singletons (habituellement des mutations délétères) dans l'échantillon. Par contre une accumulation de singletons influence peu π_n, qui prend en compte la fréquence des mutations. Par conséquent, si l'échantillon subit des effets sélectifs, π_n et θ_S ne donnent pas la même estimation de θ. Tajima (1989) a donc proposé d'utiliser la différence entre ces deux estimateurs pour tester l'existence d'un écart au modèle d'évolution neutre. La statistique utilisée est :

$$D = \frac{\pi_n - \theta_S}{\sqrt{Var(\pi - \theta_S)}}$$

Dans le cas d'une sélection directionnelle et purificatrice, un haplotype augmente fortement en fréquence et remplace les autres. Il y a parallèlement une accumulation de mutations neutres ou faiblement délétères. On a donc de nombreux haplotypes rares avec une majorité de singletons. π_n est donc plus faible que θ_S et D est donc négatif. Dans le cas d'une sélection balancée (sélection directionnelle non encore à l'équilibre ou sélection fréquence-dépendante), la majorité des haplotypes ont une fréquence intermédiaire et π_n est donc plus élevé que ce qui est attendu sous un modèle d'évolution neutre. Par contre θ_S n'est pas ou peu affecté. On a donc une valeur positive de D. Lors d'une expansion de population, on observe une accumulation de nouvelles mutations qui entrainent une augmentation du nombre de sites polymorphes et du nombre d'haplotypes rares. θ_S augmente donc fortement, tandis que π_n est peu affecté. On observe donc une valeur négative de D. Dans le cas d'une contraction de population, on a au contraire une réduction du nombre de sites polymorphes et donc une valeur positive de D. Au cours d'un évènement de bottleneck (contraction puis expansion de population), on observe initialement des valeurs positives puis négatives de D au cours des générations.

2. Test de Fu & Li

Fu & Li (1993) ont utilisé une approche similaire, mais comparent des estimateurs différents. Ils distinguent les branches internes et externes des généalogies. Les branches externes sont les branches qui ne se ramifient plus, c'est-à-dire les branches terminales de la généalogie. Les branches internes sont celles qui se ramifient (Figure II-1). Ils font la distinction entre les mutations anciennes apparues sur les branches internes (nombre η_i) et les mutations plus récentes (nombre η_e) apparues sur les branches externes de la généalogie. $S = \eta_i + \eta_e$. η_e correspond donc au nombre de singletons dans l'échantillon. Ils ont démontré que l'espérance de η_e est égale à θ : $E(\eta_e) = \theta$

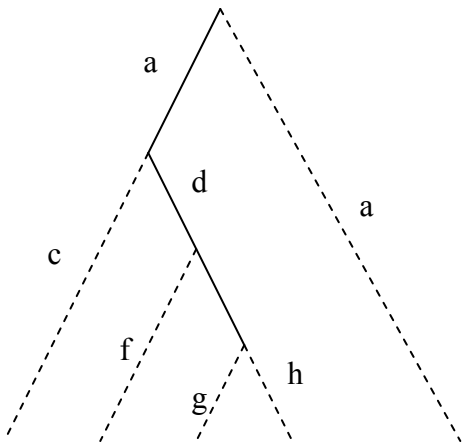


Figure II-1 Un exemple de généalogie avec 5 gènes, présentant les branches internes (traits continus) et externes (pointillés).

L'estimateur η_e est très sensible à l'accumulation de mutations externes (donc récentes et de faible fréquence) contrairement à la diversité nucléotidique π_n, qui est plus sensible aux mutations internes (anciennes et plus fréquentes dans la population). Fu & Li (1993) ont donc proposé de comparer η_e et π_n de la façon suivante :

$$F = \frac{\pi_n - \eta_e}{\sqrt{Var(\pi_n - \eta_e)}}$$

L'interprétation est similaire à celle du test de Tajima. Suite à une expansion démographique, un évènement de sélection positive ou en présence de sélection purifiante, on observera un excès de mutations récentes (η_e) et F est négatif. En présence d'un goulot d'étranglement ou de sélection fréquence dépendante, la majorité des mutations sont anciennes (π_n) et on observe un déficit de mutations récentes (η_e). F est alors positif. Ce test est plus puissant que le test de Tajima et le test de Fu dans le cas de la sélection purifiante

mais est moins puissant que ces derniers dans le cas d'une expansion démographique ou d'un auto-stop génétique.

3. Test de Fu

Le test de Fu est un test haplotypique basé sur la relation entre le paramètre θ (ici estimé à partir de π) et le nombre d'haplotypes attendus sous l'hypothèse de neutralité. Cette relation est donnée par la formule d'Ewens (Ewens, 1972). Fu a défini la probabilité d'observer un nombre d'haplotype inférieur ou égal au nombre d'haplotypes observés connaissant le nombre moyen de différences nucléotidiques par paire de séquences $\hat{\theta}_\pi$:

$$S' = p(k_0 \leq k \mid \theta = \hat{\theta}_\pi) = \sum_{k \geq k_0} \frac{|S_k| \hat{\theta}_\pi^k}{S_n(\hat{\theta}_\pi)}$$

avec $S_n = \hat{\theta}_\pi(\hat{\theta}_\pi - 1)(\hat{\theta}_\pi - 2)\cdots(\hat{\theta}_\pi - n + 1)$

et S_k est le coefficient de $\hat{\theta}_\pi^k$ dans S_n (Ewens, 1972; Karlin & McGregor, 1972)

$$F_S = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Un excès d'haplotypes rares (donc de mutations récentes, par exemple suite à une expansion démographique ou un évènement de sélection positive) induit des valeurs négatives de F_S. A l'inverse, un déficit d'haplotypes rares (donc de mutations rares, par exemple dans le cas d'une sélection fréquence-dépendant) induit des valeurs positives du test.

Le test a été construit au départ pour tester l'hypothèse d'un excès du nombre d'haplotypes étant donné le nombre de mutations observées. Cependant, on peut également utiliser le test de Fu pour détecter un déficit du nombre d'haplotypes, puisque la distribution des valeurs de F_S possède deux extrémités.

E. Variabilité génétique inter-population

Il existe un grand nombre de méthodes pour étudier la différenciation génétique des populations. Certaines méthodes sont spécifiques du type de marqueur employé (haplotype, microsatellite, etc...). D'autres sont moins dépendantes du type de données analysées.

1. Test exact de différenciation des populations

Le test exact de différenciation des populations (Raymond & Rousset, 1995) peut être appliqué aux fréquences génotypiques ou aux fréquences alléliques. L'hypothèse nulle testée est "les génotypes (respectivement les allèles) présentent une distribution aléatoire au sein des

n populations analysées". Le test a été appliqué ici uniquement aux fréquences alléliques car il est plus puissant que le test basé sur les fréquences génotypiques (Goudet *et al.*, 1996). Le test utilisé est un test exact de Fisher. Le principe est le même que lors des tests de déséquilibre de liaison (partie B.4).

2. AMOVA : Analyse de variance moléculaire

L'AMOVA consiste à analyser la structuration génétique des populations par une analyse de variance et a été défini pour la première fois par Cockerham (1969; 1973). L'approche utilisée ici est celle utilisée dans le logiciel Arlequin (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier *et al.*, 2005) et qui présente l'avantage de prendre en compte le nombre de mutations entre haplotypes. L'AMOVA analyse de manière hiérarchique les composantes de la variance génétique à différents niveaux définis par l'utilisateur : différences intra-individuelles, différences interindividuelles, différences entre populations, différences entre groupes de populations, etc... Les composantes de la variance sont utilisées pour calculer les indices de fixation définis originellement par Wright (1951; 1965) : F_{SC} (différenciation entre populations, indépendamment des groupes) et F_{CT} (différenciation entre groupes de populations). Lorsque la distance entre haplotypes est prise en compte dans l'analyse, on obtient un analogue du φ_{ST}. Les différents indices calculés sont testés par permutation des individus entre populations pour les F_{ST}, des individus entre populations à l'intérieur des groupes pour les F_{SC} et des populations entre groupes pour les F_{CT}.

3. F_{ST} par paire de populations

a) Méthodes basées sur les fréquences alléliques (haplotypiques)

Le paramètre F_{ST} mesure la réduction d'hétérozygotie liée aux différences de fréquence allélique entre deux populations. Cet estimateur est classiquement utilisé pour estimer le degré de différenciation génétique entre populations. La méthode de Weir & Cockerham (1984) permet d'estimer la valeur du F_{st} de manière non-biaisée. Des estimateurs analogues au F_{ST} ont été mis au point pour prendre en considération les distances génétiques entre allèles (ou haplotypes). En effet le paramètre F_{ST} ne prend en compte que les différences de fréquence allélique, sans considérer leur distance génétique (et donc leur généalogie). Par conséquent, deux allèles identiques par état sont considérés identiques par ascendance et on se trouve sous un modèle de mutation de type IAM.

b) Méthodes prenant en compte la divergence entre allèles (haplotypes).

Des estimateurs analogues au F_{ST} ont été mis au point pour prendre en considération les distances génétiques entre allèles (ou haplotypes). En effet le paramètre F_{ST} ne prend en compte que les différences de fréquence allélique, sans considérer leur distance génétique (et donc leur généalogie). Le risque d'homoplasie est donc élevé pour certains types de marqueurs et la structuration génétique peut alors être sous-estimée.

Cependant dans le cas des marqueurs microsatellites, une mutation va entraîner l'insertion ou la délétion d'un ou plusieurs motif(s) répété(s) (Di rienzo *et al.*, 1994). On peut donc obtenir deux allèles identiques par état (c. à d. qui possèderont le même nombre de répétitions), mais différents par ascendance. Leur évolution ne suit donc pas un modèle IAM et l'utilisation de F_{ST} pourrait ne pas être appropriée. Deux autres modèles de mutation ont donc été développés pour analyser les données de type microsatellites. Le premier est le modèle SMM (Stepwise Mutation Model ; Ota & Kimura, 1973) dans lequel une mutation ajoute ou supprime un motif à la fois. Le paramètre R_{ST} (Slatkin, 1995) est basé sur la variance de la taille des allèles et est supposé être mieux adapté à un modèle de mutation de type SMM. Cependant, peu de loci microsatellites sont susceptibles de suivre un pur modèle SMM et un modèle intermédiaire a été proposé : le modèle TPM (Two Phased Model ; Di rienzo *et al.*, 1994; Valdes *et al.*, 1993) qui prend en compte la possibilité d'ajout-suppression de un ou plusieurs motifs à chaque mutation. Comme il n'existe pas d'analogue du F_{ST} pour ce type de modèle, le R_{ST} était classiquement utilisé conjointement au F_{ST} pour analyser des données de type microsatellites. Cependant, le R_{ST} présente une forte variance lorsque le nombre d'individus et le nombre de loci sont faibles (Balloux & Goudet, 2002; Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Gaggiotti *et al.*, 1999). Dans ce cas, le F_{ST} donne de meilleurs résultats. L'emploi du R_{ST} est donc à réserver à des échantillons de grande taille pour lesquels il est plus performant que le F_{ST} et cet estimateur n'a donc pas été utilisé dans ce travail.

Dans le cas des données de séquence, il peut également être intéressant de prendre en compte les distances entre haplotypes. En effet, deux haplotypes qui ne divergent que d'une mutation ponctuelle ne traduisent pas le même niveau de divergence que deux haplotypes qui divergent de 20 ou 30 mutations. Ici l'analogue du F_{ST} est nommé φ_{ST} et a été calculé par la méthode de l'AMOVA. La distance entre deux haplotypes est une distance métrique euclidienne basée sur le nombre de mutations observées entre les deux haplotypes.

F. Tests de Mantel

Les tests de Mantel consistent à comparer deux ou plusieurs matrices de distances. L'hypothèse H_0 est qu'il n'existe pas de corrélation entre les distances des matrices. La corrélation entre les matrices est testée par une procédure de permutations qui permet d'obtenir la distribution du coefficient de corrélation sous l'hypothèse nulle. Prenons le cas de la comparaison de deux matrices $X = \{x_{ij}\}$ et $Y = \{y_{ij}\}$ de dimension n. Les deux matrices doivent être symétriques et contiennent chacune $n(n-1)/2$ valeurs. La procédure de permutations consiste à redistribuer aléatoirement les valeurs d'une matrice en gardant l'autre fixe. Après chaque permutation de la matrice, un coefficient de corrélation et/ou de régression est calculé entre les matrices. Généralement, le coefficient de Mantel Z ou le coefficient de corrélation de Pearson r sont les plus utilisés :

$$Z = \sum_{i,j} X_{ij} Y_{ij} \qquad\qquad r = \frac{\mathrm{cov}(X,Y)}{\sqrt{\mathrm{var}(X).\mathrm{var}(Y)}}$$

La significativité du coefficient de corrélation est ensuite donnée par le nombre de permutation ayant donné une valeur inférieure ou égale au coefficient de corrélation observé.

Les tests de Mantel partiels sont basés sur le même principe mais permettent de tester la corrélation entre une matrice de distances et deux matrices explicatives. Le coefficient de corrélation est calculé entre la première matrice et une des matrices explicatives en tenant compte de l'effet de la troisième matrice. Dans ce cas, le coefficient de corrélation est calculé ainsi :

$$r_{YX_1.X_2} = \frac{r_{YX_1} - r_{X_1X_2} r_{YX_2}}{\sqrt{(1 - r^2_{X_1X_2})(1 - r^2_{YX_2})}}$$

La significativité des tests partiels de Mantel peut cependant être biaisée au moins dans certains cas, bien que ce biais semble être faible dans la plupart des situations (Castellano & Balletto, 2002; Raufaste & Rousset, 2001; Rousset, 2002).

Les tests de Mantel ont été effectués pour tester l'hypothèse d'un isolement par la distance, c'est-à-dire d'une corrélation positive entre la distance géographique et la divergence génétique des populations et l'hypothèse d'une influence des prévalences de *Wolbachia* sur la structuration génétique de l'ADN mitochondrial. Rousset (1997) a montré que sous un modèle d'isolement par la distance dans un espace bidimensionnel, il existe une relation linéaire entre la distance génétique $F_{ST}/(1-F_{ST})$ et le logarithme de la distance géographique. Par conséquent, j'ai des matrices des logarithmes des distances géographiques et des indices de différenciation

génétique $F_{ST}/(1-F_{ST})$ pour les données des loci microsatellite, du locus mitochondrial et de prévalence de *Wolbachia* et $\varphi_{ST}/(1-\varphi_{ST})$ pour les données du locus mitochondrial. Les distances géographiques ont été mesurées "à vol d'oiseau" à l'aide du logiciel CartoExploreur 3®.

G. Mesure des flux de dispersion Nm

Slatkin (1985) distingue deux types d'approches pour estimer les flux de dispersion entre populations naturelles. D'une part, les 'approches directes' comprennent toutes les méthodes d'observations de terrain des événements de dispersion et de leur étendue. Ces méthodes comprennent par exemple les méthodes de capture-recapture ou de radio-tracking. Bien que les approches directes donnent de bons résultats dans certaines conditions, elles se révèlent difficilement applicables sur certaines espèces à cause de l'impossibilité de marquer les individus (taille, etc.) ou à cause de la difficulté à recapturer une proportion importante d'organismes très mobiles. Le deuxième type d'approches comprend les 'approches indirectes' basées sur l'estimation de flux de dispersion à partir d'une structuration génétique observée.

La méthode la plus classique est tirée des formules de Wright (1931). Elles établissent la relation entre différenciation génétique et nombre de migrants par génération. L'évolution de la composition génétique d'une population dépend d'un certain nombre de forces : dérive génétique, sélection, migration, mutation. Pour un gène neutre (sans sélection), une forte différenciation entre populations (fortes valeurs F_{ST}) est classiquement considérée comme le signe d'un faible taux de dispersion m. Inversement, l'absence de différenciation (valeurs F_{ST} proches de 0) entre populations indique un fort taux de dispersion. Il est donc possible d'estimer le nombre de migrants à chaque génération à partir d'indices de structuration tels que le F_{ST}. Dans son modèle en îles, Wright (1931) a démontré l'existence d'une relation simple entre F_{ST} et Nm. Cette relation est différente selon le type de marqueur et selon le mode de reproduction de l'espèce considérée. Nous ne considérerons ici que les espèces diploïdes à reproduction sexuée. Pour un marqueur nucléaire transmis par les deux parents :

$$F_{ST} = \frac{1}{1+4Nm}$$

et pour un marqueur transmis par un seul parent (génomes haploides : chromosome Y, ADN mitochondrial, etc.) :

$$F_{ST} = \frac{1}{1+Nm}$$

avec N, la taille efficace de la population et m, le taux de migration par génération. Ces

formules ont été très largement appliquées dans la littérature à des données empiriques pour estimer le paramètre *Nm* (voir par exemple : Girman *et al.*, 2001; voir par exemple : Salvato *et al.*, 2002; Sanetra & Crozier, 2003; Seielstad *et al.*, 1998). Cependant, plusieurs auteurs ont rappelé que les modèles théoriques de base comme le modèle en île de Wright sont lourds d'hypothèses qui sont rarement respectées en milieu naturel (Bossart & Pashley Prowell, 1998; Lewontin, 1985; Slatkin, 1989; Whitlock & McCauley, 1999). Whitlock & McCauley (1999) ont fait une revue des hypothèses généralement irréalistes du modèle en île. L'estimation du paramètre *Nm* à partir de ce modèle, bien que très répandue, ne peut être qu'indicative. Il faut noter que dans la plupart des études, l'objectif n'est pas d'estimer *Nm*, mais de caractériser la structuration des populations analysées (métapopulation, isolement par la distance, etc.) et l'estimation de *Nm* est alors superflue. Lorsque l'objectif est d'estimer *Nm* et lorsque cela est possible, il est préférable de construire un modèle spécifique à l'espèce étudiée qui incorpore le maximum de traits d'hoistoire de vie de l'espèce.

H. Biais de structuration génétique et biais de dispersion liés au sexe

La dispersion des individus d'une espèce donnée n'est pas forcément identique pour tous les individus. De nombreuses études ont mis en évidence des comportements de dispersion différents selon le sexe des individus, en particulier chez les mammifères et les oiseaux (Greenwood, 1980). La caractérisation des flux de dispersion nécessite donc non seulement d'estimer les flux totaux entre populations, mais aussi d'évaluer la part relative de ces flux correspondant à chaque type d'individus. Il peut s'agir du sexe, mais aussi d'autres facteurs comme le statut d'infection à un parasite donné. Afin de détecter des biais de dispersion, différents types d'approches indirectes existent et peuvent être classées en deux catégories.

1. Utilisation de marqueurs de classes différentes

La 1ère approche, et la plus répandue, consiste à comparer des marqueurs génétiques hérités différemment. On peut distinguer 3 types de marqueurs : les marqueurs hérités uniquement de la mère (ADN mitochondrial), les marqueurs hérités des deux parents (ADN nucléaire) et les marqueurs hérités uniquement du père (chromosome Y). La plupart des études basées sur cette approche ont consisté à comparer des marqueurs nucléaires (allozymes, microsatellites, AFLP, RAPD, etc…) avec un marqueur mitochondrial (séquence, RFLP, etc…). L'étude d'un marqueur génétique transmis par un seul parent (en fait par un seul

sexe) à la descendance permet d'estimer les flux de gènes du sexe qui transmet ce gène. La comparaison de la structuration observée sur ce marqueur avec un marqueur transmis par l'autre sexe ou par les deux peut permettre de détecter un biais de dispersion entre les sexes et d'estimer l'importance de ce biais. Bien que permettant d'estimer directement les flux de dispersion des mâles, peu de gènes liés au chromosome Y ont montré suffisamment de polymorphisme pour être utiles en génétique des populations et n'ont donc que rarement été utilisés (cependant, voir (Perez-Lezaun *et al.*, 1999; Seielstad *et al.*, 1998). Chez les espèces dont les femelles sont philopatriques et dont les mâles dispersent, on s'attend à observer une structuration plus forte de l'ADN mitochondrial que des marqueurs génétiques nucléaires. De nombreuses études ont confirmé ce patron de structuration chez des espèces présentant des biais de dispersion en faveur des mâles.

Ainsi, les différences de structuration observées entre deux classes différentes de marqueurs, peuvent refléter autre chose qu'un biais de dispersion lié au sexe, telles que des tailles effectives différentes entre les sexes, des taux de mutation différents entre les marqueurs utilisés (Chesser & Baker, 1996) ou des différences de pression de sélection (autostop génétique, sélection, etc). Hurst & Jiggins (2005) ont en particulier fait une synthèse des effets possibles des organelles parasites tels *Wolbachia pipientis, Microsporidia*, *Rikettsia* et *Spiroplasma* sur la structuration génétique de l'ADN mitochondrial. Ballard & Whitlock (2004) ont revu l'ensemble des facteurs pouvant rendre les marqueurs génétiques mitochondriaux inutilisables pour estimer des flux de dispersion. Ils précisent toutefois que la comparaison d'un marqueur mitochondrial et de marqueurs nucléaires peut apporter des informations sur la biologie des parasites endosymbiotiques associés (transmis de la même façon que les mitochondries) ou sur l'évolution de la mitochondrie elle-même.

2. Utilisation de marqueurs de même classe.

Depuis quelques années et à cause des problèmes liés à la comparaison de classes différentes de marqueurs, de plus en plus d'études se basent sur la comparaison de la structuration génétique des mâles et des femelles avec une seule classe de marqueurs, le plus souvent des loci microsatellites nucléaires. Différentes approches sont possibles et peuvent être combinées. Un autre avantage qui nous intéresse dans cette étude est qu'on peut appliquer ce type d'analyse non seulement pour comparer des individus de sexe différent, mais également pour comparer des groupes d'individus classés selon d'autres critères que le sexe (par exemple infectés par des parasites ou non, dominants et dominés, reproducteurs et non-reproducteurs, etc.). Dans cette partie, le type dispersant et le type philopatrique

correspondent respectivement aux groupes d'individus qui ont une forte tendance à disperser et qui ont tendance à être sédentaire.

a) Différenciation génétique des populations : F_{ST}

Un autre moyen de détecter des biais de dispersion est de comparer les F_{ST} calculés entre les types d'individus à comparer. On s'attend à obtenir des valeurs F_{ST} plus faibles pour le type dispersant car la présence de migrants parmi les dispersants diminue les différences de composition génétique de ce groupe par rapport aux différences génétiques observées pour le groupe philopatrique (qui contient moins de migrants). Il existe trois méthodes pour comparer les valeurs F_{ST} des deux types d'individus. La première méthode possible consiste à calculer un estimateur F_{ST} global sur l'ensemble des populations pour chaque type d'individus ainsi que les intervalles de confiance associés par une méthode de permutation. Une différence significative est observée si les intervalles de confiance ne se chevauchent pas (voir par ex. Mossman & Waser, 1999). La deuxième méthode consiste à comparer les valeurs F_{st} obtenues par paires de populations mais cette méthode peut présenter un problème de pseudoréplication des échantillons (Knight *et al.*, 1999). La troisième méthode proposée par Goudet *et al.* (2002) et utilisée ici consiste à comparer les valeurs F_{ST} obtenues pour chaque type d'individus. La distribution théorique des valeurs F_{ST} sous l'hypothèse nulle d'absence de biais de dispersion est obtenue par permutation des individus entre catégories en respectant les proportions de chaque type d'individus. La probabilité associée à la valeur réelle est alors égale à la proportion de valeurs simulées, égales ou supérieures à la valeur réelle.

L'utilisation du paramètre F_{ST} est généralement appliquée à des marqueurs nucléaires. Cependant, quelques auteurs l'ont utilisé avec succès sur des marqueurs mitochondriaux pour détecter un biais de dispersion entre mâles et femelles en appliquant la même logique que pour les marqueurs nucléaires (Escorza-Trevino & Dizon, 2000; O'Corry-Crowe *et al.*, 1997). Cependant, à ma connaissance, rien n'a jamais été publié sur un biais éventuel de la structuration de l'ADN mitochondrial entre mâles et femelles causé par des parasites endosymbiotes. J'ai donc effectué un test sur F_{ST} de biais de structuration génétique entre mâles et femelles lorsque cela a été possible pour (i) tester les effets éventuels des facteurs féminisants présents chez *A. vulgare* (*Wolbachia pipientis* et *f*) sur un biais éventuel de structuration entre mâles et femelles et (ii) si possible vérifier les résultats obtenus sur les données microsatellites.

b) Ecart au modèle Hardy-Weinberg : F_{IS}

De la même façon que pour les F_{ST}, on utilise les F_{IS} pour détecter un biais de dispersion. En effet, parmi le type dispersant, on observera davantage d'individus immigrants (Goudet *et al.*, 2002). On observera donc un effet Wahlund et un déficit en hétérozygote. La valeur F_{IS} sera positive et plus élevée parmi le type dispersant que parmi le type sédentaire. La significativité du biais est testée par permutation de la même façon que pour les F_{ST} (cf. paragraphe précédent).

c) Apparentement *r* entre individus

Pour un taux de dispersion donné, les individus proches géographiquement les uns des autres sont en moyenne plus apparentés entre eux que des individus pris au hasard dans l'ensemble de la population. Si un type d'individu disperse plus que l'autre, on doit s'attendre à un plus fort apparentement entre les individus du type philopatrique qu'entre les individus du type dispersant au sein d'une population donnée. On peut suivre le même raisonnement dans des populations subdivisées et estimer l'apparentement entre individus de chaque type et de chaque sous-population. Cette statistique est liée au F_{ST} par la relation suivante (Hamilton, 1971; Queller & Goodnight, 1989) :

$$r = \frac{2F_{ST}}{1 + F_{IT}}$$

Le biais de valeur d'apparentement est également testé par permutation des individus entre catégories (voir partie II.H.2.a)a).

Une variante de cette approche consiste à tester la présence d'un isolement par la distance et à comparer la pente de la courbe "apparentement en fonction de la distance géographique" entre individus (Knight *et al.*, 1999).

d) Indice d'assignement *AI*

L'indice d'assignement a été proposé par Paetkau *et al.* (1995) puis il a été modifié par Favre *et al.* (1997). Pour chaque individu j de la population k, on calcule la probabilité d'apparition de son génotype P_{kij} (produit de la fréquence de chacun de ses deux allèles). En l'absence de déséquilibre de liaison, la probabilité d'un génotype multilocus est égale au produit des probabilités de chaque locus. La diversité génétique des populations peut fortement varier, ces probabilités ne sont pas directement comparables. La probabilité moyenne de l'échantillon est donc soustraite à la probabilité individuelle du génotype, après une transformation logarithmique :

$$AIc_{kj} = \log\left[\prod_{i=1}^{l} P_{kij}\right] - \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log\left[\prod_{i=1}^{l} P_{kij}\right]$$

avec l loci et n individus dans le $k^{\text{ème}}$ échantillon.

La distribution de l'AIc est centrée sur 0. Un AIc positif indique que le génotype est plus probablement un résident et une valeur négative qu'il s'agit d'un immigrant. On peut s'intéresser à la moyenne et à la variance de l'AIc (respectivement *m*AIc et *v*AIc) pour tester un biais de dispersion. En effet, les migrants présenteront en moyenne une valeur plus faible de *m*AIc que les sédentaires car ils seront originaires d'autres populations. De même, parce que le type dispersant comprendra à la fois des immigrants (mélange de faibles et de fortes valeurs d'AIc) et des résidants, *v*AIc sera plus élevée que pour le type sédentaire (principalement des fortes valeurs d'AIc). Ces deux paramètres sont également testés par permutation des individus entre catégories (voir partie II.H.2.a)a).

I. Seuil de significativité des tests multiples

Lors d'un test statistique, une valeur significative au seuil de 5% signifie que la probabilité d'observer cette valeur par hasard est inférieure à 5%. Autrement dit, on a moins d'une chance sur 20 d'obtenir cette valeur par hasard. Si on réalise le même test plusieurs fois, par exemple vingt fois, on peut donc s'attendre à ce qu'un test soit significatif au seuil de 5% alors que sa valeur n'est due qu'au seul hasard. Si on en réalise 100, on s'attend à 5 tests significatifs du seul fait du hasard. Plus le nombre de tests réalisés simultanément sera grand, plus le nombre de valeurs significatives par hasard sera grand. Par conséquent, lorsqu'un grand nombre de tests est effectué simultanément sur des échantillons différents, par exemple lorsque l'on teste les déséquilibres de liaison ou des valeurs de F_{ST}, on doit corriger la valeur

seuil de 5% en fonction du nombre de tests effectués par une correction de Bonferroni (Rice, 1989).

Lorsque *k* tests sont effectués, la correction de Bonferroni consiste à diviser la valeur seuil α=0,05 par *k*. Ainsi, si 10 tests sont réalisés simultanément, on utilisera la valeur seuil $\alpha_{corr.}$ = 0,05/10 = 0,005. Cependant, plus le nombre de tests est grand, plus la valeur du seuil de significativité sera faible et plus le test perdra en puissance. Pour limiter la perte de puissance, on peut utiliser des corrections séquentielles de Bonferroni. Dans un premier temps, on classe les valeurs des tests par ordre croissant de probabilité. On compare ensuite la valeur la plus faible au seuil $\alpha_{corr.}$. Si cette valeur n'est plus significative, on arrête la procédure et aucune des valeurs des tests n'est significative. Par contre, si la valeur est toujours significative, on recommence la procédure avec les *k*-1 valeurs restantes des tests. On calculera alors une valeur $\alpha_{corr.}$ = 0,05/(*k*-1). On continue cette procédure jusqu'à ce que plus aucune valeur de test ne soit significative.

III.Polymorphisme du parasite *Wolbachia* : féminisation et recombinaisons intergénomiques

L'existence d'un polymorphisme des lignées *Wolbachia* féminisantes présentes chez *A. vulgare* a récemment été montrée (Cordaux *et al.*, 2004). En effet, l'analyse du polymorphisme du gène bactérien *wsp* a permis d'identifier deux souches génétiquement très divergentes et présentant des traits d'histoire de vie différents. Cependant, l'échantillonnage de cette étude n'était pas exhaustif et le polymorphisme intra-population n'est pas connu, d'autant plus que les auteurs des études précédemment publiées sur les prévalences de *Wolbachia*, ne disposaient pas de marqueurs génétiques suffisamment variables pour détecter ce polymorphisme. La première étape de ce travail de thèse a donc consisté à analyser le polymorphisme des souches *Wolbachia* par séquençage du gène *wsp* dans plusieurs populations infectées d'*A. vulgare*, *A. nasatum* et *A. album*. Ce travail a permis de montrer l'existence d'une troisième souche chez *A. vulgare* (*w*VulP), très proche génétiquement de *w*VulC. Contre toute attente, *w*VulP et *w*Nas (la souche présente chez *A. nasatum*) présentent en outre la particularité d'être issues de la recombinaison de deux autres souches, probablement *w*VulC et *w*VulM. Afin de mesurer l'étendue des recombinaisons, six autres gènes ont également été séquencés : groE et les cinq gènes utilisés dans le système de génotypage multilocus mis au point par Baldo *et al.* (2006) : *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* et *fbpA*.

Les recombinaisons entre *Wolbachia* ont fait l'objet d'un grand nombre de publications (Baldo *et al.*, 2005a; Baldo *et al.*, 2005b; Jiggins *et al.*, 2001a; Jiggins, 2002; Keller *et al.*, 2004; Malloch & Fenton, 2005; Reuter & Keller, 2003; Werren & Bartos, 2001). L'originalité des résultats présentés ici vient du fait que le phénotype féminisant ne favorise pas les infections multiples entre souches de *Wolbachia*, contrairement à l'incompatibilité cytoplasmique (Frank, 1998). Un contact étroit entre bactéries parait indispensable pour qu'aient lieu des évènements de recombinaison. Cependant, les infections multiples n'ont à ce jour jamais été observées chez les isopodes. Les résultats confirment donc l'hypothèse que de telles infections multiples, même si elles ne sont pas durables, sont apparues (Cordaux *et al.*, 2001; Cordaux *et al.*, 2004).

Article paru dans la revue *Gene* 397(1-2):58-66, http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.006.

Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*

Keywords: endosymbiosis; *wsp*; genome plasticity; feminization.

Authors: Verne Sébastien*, Johnson Monique, Bouchon Didier & Grandjean Frédéric

Affiliation: Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers, 40, avenue du Recteur Pineau, F-86022 Poitiers Cedex, *France*.

Abbreviations :
bp : base pair
CI : cytoplasmic incompatibility
HVR : hypervariable region
MLST : multilocus sequence typing

* Correspondance: Université de Poitiers, Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022 POITIERS Cedex, FRANCE, phone: +33 (0)5 49 36 62 46, fax: +33 (0)5 49 45 40 15, e-mail: sebastien.verne@etu.univ-poitiers.fr

Abstract:

Wolbachia are maternally inherited endosymbiotic α-Proteobacteria infecting a wide range of arthropods. *Wolbachia* induce feminization in many terrestrial isopod species, particularly in the genus *Armadillidium* (Crustacea, Oniscidea). The diversity of *Wolbachia* strains infecting *Armadillidium* species was examined. Results reveal that natural populations of *A. vulgare* contain three different *Wolbachia* strains (*w*VulC, *w*VulM and *w*VulP). The *wsp* gene and its 3′-adjacent region show evidence that two recombination events have occurred between two of these strains. In both cases, multiple statistical analyses suggest that a small gene fragment of a strain closely related to *w*VulM (minor parent) is inserted into the genome of another strain closely related to *w*VulC (major parent). Although multiple infections in a single individual have never been demonstrated in natural population, the existence of

recombination between feminizing strains suggests that bi-infections are possible, or at least that bi-infections can be maintained sufficiently long enough to allow recombination. Recombination events increase genetic diversity of *Wolbachia* found in *Armadillidium* species and may play a role in the ability of *Wolbachia* strains to invade new hosts.

A. Introduction

Wolbachia are maternally inherited endosymbiotic α-Proteobacteria infecting a wide range of nematodes and arthropods (O'Neill *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1999a). Depending on both the bacterial lineage and host, they may have very diverse effects on host reproduction, such as cytoplasmic incompatibility (CI), male killing, parthenogenetic reproduction or feminization of genetic males (Rigaud, 1999; Stouthamer *et al.*, 1999a). In terrestrial isopod species (Crustacea, Oniscidea), *Wolbachia* induce CI in two species, *Porcellio dilatatus petiti* and *Cylisticus convexus* (Legrand & Juchault, 1986; Moret *et al.*, 2001) and feminization in many others, including members of the genus *Armadillidium,* such as *A. vulgare* and *A. nasatum* (Bouchon *et al.*, 1998; Rigaud *et al.*, 1991). Feminization occurs through conversion of genetic males into functional females, which typically produce female-biased progenies (Rigaud *et al.*, 1997). Recently, based on *wsp* gene sequences, two distinct feminizing *Wolbachia* strains have been found in various populations of *A. vulgare* (Cordaux *et al.*, 2004). The comparison of bacterial strains and their respective host mitochondrial phylogenies showed no concordance, indicating horizontal transmission of the *Wolbachia* strains within populations of *A. vulgare*. *A. vulgare* is to date the only known species of terrestrial isopod to host more than one *Wolbachia* strain (Bouchon *et al.*, 1998). Despite extensive sampling efforts, no multiple infections in single individuals of isopod species have been so far recorded. This suggests that feminization establishes a high competition between *Wolbachia* and/or that multi-infection is unstable in these species. Since no multiple infections have been discovered in isopod species, recombination within and between *Wolbachia* strains is basically unexpected. However, Baldo *et al.* (2005b) have shown evidence for recombination in some *Wolbachia* strains of isopods. The evolutionary context of these recombination events is difficult to understand as horizontal transfers would be rare events between some of the involved host species as they live in different habitats.

The first example of recombination was described between two *Wolbachia* strains (belonging to the supergroup B) of a parasitoid wasp and its fly host (Werren & Bartos, 2001). Since then, a growing number of publications have revealed other recombination

events within *Wolbachia* chromosomal genes, a large number of which involve *wsp* (Baldo *et al.*, 2005a; Baldo *et al.*, 2005b; Jiggins *et al.*, 2001a; Jiggins, 2002; Keller *et al.*, 2004; Malloch & Fenton, 2005; Reuter & Keller, 2003; Werren & Bartos, 2001). Recombination can also occur between highly divergent strains belonging to different supergroups (Baldo *et al.*, 2005a; Baldo *et al.*, 2005b; Jiggins, 2002; Malloch & Fenton, 2005). Therefore recombination may be common in *Wolbachia* and may confuse phylogenetic relationship reconstructions based on a single gene. Moreover, several studies in different insect species specify lateral transfer of the phage WO-B between co-infecting *Wolbachia* strains (Bordenstein & Wernegreen, 2004; Masui *et al.*, 2000) and intragenic recombination may be common in extra-chromosomal DNA, including phage and transposable elements (Bordenstein & Wernegreen, 2004; Duron *et al.*, 2005).

For lateral DNA transfers that are not phage-mediated, bacteria must come into close contact (Jiggins, 2002). As *Wolbachia* are vertically transmitted endosymbionts, opportunities for recombination between different types would appear to be restricted except in the case of multiple infections.

In this paper we wish to test the occurrence of genetic exchange between feminizing *Wolbachia* strains. To address this issue we analyzed *Wolbachia* polymorphism within three host species belonging to the *Armadilllidium* genus. Results strongly suggest two independent recombination events between the two *Wolbachia* strains (*w*VulC and *w*VulM) infecting sympatric *Armadillidium* species. The origin and evolutionary implications of recombination events and horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* strains are discussed.

B. Materials and Methods

1. Sampling and sequencing

Three populations of *A. vulgare* (originating from Poitiers, Ensoulesse and Chizé) and a population of *A. nasatum* (originating from Frelinghien) were sampled in France (Table III-1). The population of Poitiers was sampled in 2003 and in 2006. The infection status of each specimen was assessed by PCR assay of the *Wolbachia wsp* gene as described below. Additionally, one infected female of *A. album* collected at Yves (France) for which the *Wolbachia* strain has previously been identified (Bouchon *et al.*, 1998) was included in this study. This strain will be denoted *w*Album to avoid confusion with the strain infecting *Aedes albopictus* (called *w*Alb, according to the nomenclature of Zhou *et al.*, 1998).

Table III-1 *Wolbachia* prevalences in the sampled populations of three *Armadillidium* species.

Sampled locality	Sample year	*N* ♂/♀	Number of infected females :				
Armadillidium vulgare			*w*VulM	*w*VulC	*w*VulP	*w*Nas	*w*Album
Ensoulesse	2003	10/9	1		1		
Poitiers	2003	10/8	1	3	4		
Poitiers	2006	5/14	1		9		
Chizé Biological Reserve	2003	5/14	3	5			
Armadillidium nasatum							
Frelinghien	2006	5/22				6	
Mignaloux *	1993	0/19				4	
Amou *	1995	3/3				1	
Armadillidium album							
Yves	1994	1/7					6

* samples from Bouchon et al. (1998)

DNA extraction, PCR amplification and sequencing of the *wsp* region from all infected individuals were performed as described in Michel-Salzat *et al.* (2001). To infer the size of the recombinant fragments, the 3' adjacent region of the *wsp* gene was sequenced. PCR amplifications were performed using *wsp* 81F primer (Braig *et al.*, 1998) and a primer RPOHR (5'-TTAAHCCYATRTTWCCTTC-3') designed inside the heat shock σ-factor *rpoH* gene which is located downstream of the *wsp* gene in the *w*Mel genome (Wu *et al.*, 2004). PCR cycling conditions were: 95°C for 2 min; 38 cycles at 95°C for 1 min, 45°C for 1 min, 72°C for 1 min 40 sec.; 72°C for 5 min.; then held at 4°C. PCR products were purified using QiaQuick PCR purification kits (Qiagen). Sequencing was performed using a BigDye v3.1 terminator sequencing kit and an ABI 3130 Genetic Analyzer. By using primers *wsp* 81F, *wsp* 691R (Braig *et al.*, 1998), RPOHR and an internal forward primer 411F (5'-AAATCAAACTTTACGCTGGCG-3'), we obtained complete sequences of 1136 to 1146 bp, depending on the *Wolbachia* strains. These sequences comprise 606 to 615 bp of the 3' end of the *wsp* gene, 296 to 297 bp of a non coding intergenic region and 234 bp of the 5'-region of the heat shock σ-factor *rpoH* gene. In order to measure the range of recombination, we also sequenced six other *Wolbachia* genes, namely *groE* operon that includes a non-coding intergenic region together with *groES* and *groEL* (with primers groEF1 5'-GAAGAAAAACAAGGTGGAATT-3' and groER1 5'-GTACCATCACCAACTTTGTC-3'; D. Bouchon *pers. com.*) and 5 genes widely distributed across the *Wolbachia* genome and used in a multilocus sequence typing approach (Baldo *et al.*, 2006): *ftsZ* (with primers ftsZf1 and ftsZr1, Werren *et al.*, 1995a), *gatB*, *coxA*, *hcpA* and *fbpA*. PCR conditions and sequencing reactions were performed as those described by (Baldo *et al.*, 2006). All sequences were deposited in Genbank-EMBL databases under the accession numbers DQ778095-DQ778107 and EF451545-EF451564 (Table II-2).

2. Evolutionary analyses

All sequences were manually aligned taking into account their amino acid translation. Sequences of *wsp* and *groE* were aligned with sequences from 20 A- and B- *Wolbachia* strain Supergroups downloaded from Genbank (listed in Table 2). In the phylogenetic analyses, the 4th hypervariable region of *wsp* (Baldo *et al.*, 2005b ; positions 500-569 of wVulC sequence) was removed from the alignment because the most divergent sequences could not be aligned with confidence in this region. Neighbor-joining analyses were conducted using MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) based on Kimura two-parameter distances. Bootstrap analyses were carried out with 1000 replicates.

Analysis of recombination was done using the whole sequenced part of *wsp* gene (from 606 to 615 bp long according to the strains), 4th HVR and 3'-adjacent region (from 530 to 531 bp) included, leading to a total length of 1155 bp. The 4th HVR was included as it was possible to align the sequences of the five studied strains with confidence in this region. In order to increase the power of detection and minimize false positive inference (Posada, 2002), we used four recombination detection methods implemented in the RDP software package (Martin & Rybicki, 2000): RDP, Bootscanning (Salminen *et al.*, 1995), Chimaera (Maynard Smith, 1992; Posada & Crandall, 2001) and SiScan (Gibbs *et al.*, 2000). All methods were used with default parameters except Bootscanning (scan parameters: window size = 200; step size = 15). We also used the recombination analyses provided in DNASP v. 4 (Rozas *et al.*, 2003), which calculate the minimum number of recombination events, ρ_M, according to Hudson and Kaplan (Hudson & Kaplan, 1985). DNASP was also used to locate the sites where putative recombination events have taken place. To test the possibility of intragenomic recombination, the recombinant fragments were independently analyzed using BLAST against *Wolbachia* genomes already accessible: *w*Mel from *Drosophila melanogaster* (Wu *et al.*, 2004), *w*Bm from *Brugia malayi* (Foster *et al.*, 2005), *w*Ana from *D. annanassae* (Salzberg *et al.*, 2005) and *w*Pip from *Culex quinquefasciatus* on Sanger website (http://www.sanger.ac.uk/Projects/W_pipientis/).

Table III-2 List of *Wolbachia wsp*, *ftsZ* and *groE* sequences drawn from GenBank or newly sequenced which where used for phylogenetic analysis. No differences were observed between sequences obtained from Isopod species and the previously published corresponding sequences show no differences. * this study; † Schulenberg *et al.* (2000); ‡ Cordaux *et al.* (2004); § Cordaux *et al.* (2001); ¤ Bouchon *et al.* (1998).

		wsp	*ftsZ*	*groE*
Isopod strains	*Armadillidium vulgare w*VulC	DQ778095 * AJ419986 ‡ AJ419987 ‡	DQ778100 * AJ223244 ¤	DQ778103 *
	*Armadillidium vulgare w*VulM	DQ778097 * AJ419984 ‡ AJ419985 ‡	DQ778101 *	DQ778104 *
	*Armadillidium vulgare w*VulP	DQ778096 * AJ269474 †	DQ778102 *	DQ778105 *
	*Armadillidium nasatum w*Nas	DQ778098 * AJ276600 §	AJ223244 ¤	DQ778106 *
	*Armadillidium album w*Album	DQ778099 * AJ276599 §	AJ223245 ¤	DQ778107 *
Other strains	*Acraea alcinoe*	AJ271196		AJ318483
	Acraea encedon	AJ130716		AJ318482
	Acraea eponina	AJ271194		AJ318486
	Aedes albopictus	AY462863		AJ511281
	Aedes pseudalbopictus	AF317487		AJ511282
	Asobara tabida	AY581193, AF124856		AY578349, AJ634749
	Culex (Eumelanomyia) sp.	AF317480		AJ511283
	Culex brevipalpis	AF317477		AJ511290
	Culex fuscocephala	AF317481		AJ511284
	Drosophila melanogaster	NC_002978		NC_002978
	Drosophila ananassae	AY858801		NZ_AAGB01000
	Elenchus japonicus	AB039281		AB039281
	Ephestia kuehniella	AF071911		AB002290
	Hypolimnas bolina bolina	AB085181		AB167350
	Laodelphax striatella	AB039042		AB039040
	Leptopilina heterotoma	AF124860		AJ634748
	Sogatella furcifera	AF481185		AB039041
	Teleogryllus taiwanemma	AB035514		AB002286
	Tripteroides aranoides	AY462857		AJ511293

C. Results

1. *Wolbachia* strains polymorphism

Infection statuses of sampled specimens are summarized in Table III-1. The *wsp* sequences were obtained from 29 *Wolbachia*-infected females of *A. vulgare*. Based on the *wsp* sequences, three different strains were observed, including the two previously known as *w*VulC and *w*VulM (Cordaux *et al.*, 2004), and a new one, named *w*VulP (for *Wolbachia A. vulgare* type Poitiers). The strains *w*VulC, *w*VulM and *w*VulP infected eight females, six females and fourteen females of the whole sample, respectively (Table III-1). Eleven females

of *A. nasatum* were infected by the same *w*Nas *Wolbachia* strain whose *wsp* sequence was identical to that previously published (Cordaux *et al.*, 2001). Each infected female harboured a single *Wolbachia* strain, as shown by the direct sequencing of the purified PCR products, which revealed no ambiguity or discrepancy within or between the analysed strands of each *wsp* sequence.

groE gene was sequenced in all infected females. Three different sequences were found in *groE* sequences occurring in (i) *w*Album and *w*VulM, (ii) *w*VulC and *w*VulP and (iii) *w*Nas. The *w*Nas sequence differed by only one substitution from *w*VulC and *w*VulP sequences. *w*Album and *w*VulM differed only by 6 substitutions from *w*VulC and *w*VulP sequences (Figure III-1). Multi locus genes show low polymorphism: *ftsZ*, *coxA* and *gatB* show no polymorphism between analyzed strains whereas *hcpA* shows a distinct allele in *w*VulM (one single substitution) and *fbpA* shows a distinct allele in *w*Album (six substitutions). This low polymorphism confirms the close relationship of *w*VulC, *w*VulP and *w*Nas. As observed on *wsp* sequences, direct sequencing of the purified PCR products of all these genes revealed no ambiguity or discrepancy suggesting the absence of multiple infections in a single individual.

2. Recombination analysis

Alignments of the *wsp* sequences and their adjacent 3′-regions suggest two recombination events with four breakpoints (Figure III-2 and Table III-3). The first recombinant fragment is detected with the highest probabilities in the *w*VulP strain by four of the methods: RDP ($P < 10^{-6}$), Bootscanning ($P < 10^{-6}$), Chimaera ($P < 10^{-4}$) and Siscan ($P < 10^{-4}$). Major and minor parents are respectively identified as *w*VulC and *w*VulM. The size of the recombinant fragment is 61 bp located in the 4th HVR of *wsp* (1st breakpoint between positions 495 and 505 and second breakpoint between positions 564 and 599). In the 3′end of the *wsp* sequence (504 base pairs), *w*VulP is more closely related to *w*VulC than to *w*VulM (99.8% and 90.2% identity, respectively). In the last 576 bases (non-coding region and *rpoH* 5′ end) *w*VulP is also more closely related to *w*VulC than to *w*VulM (99.3% and 97.0% identity respectively). On the contrary, in the recombinant region (61 bp), *w*VulP is closely related to *w*VulM and more distantly related to *w*VulC (88.8% and 50.6% identity respectively; Figure III-2). In the 3′ end of the *wsp* sequence (504 base pairs), only one non-synonymous substitution is found at position 433 of the nucleotide sequence (position 144 of the protein sequence, aspartic acid in *w*VulC and asparagine in *w*VulP, see Figure III-3). Within the recombinant region, the

observed divergence leads to 10 amino acid changes when compared to the *w*VulC protein sequence (excluding indels; Figure III-3). No stop codon or frame shift was found in this region.

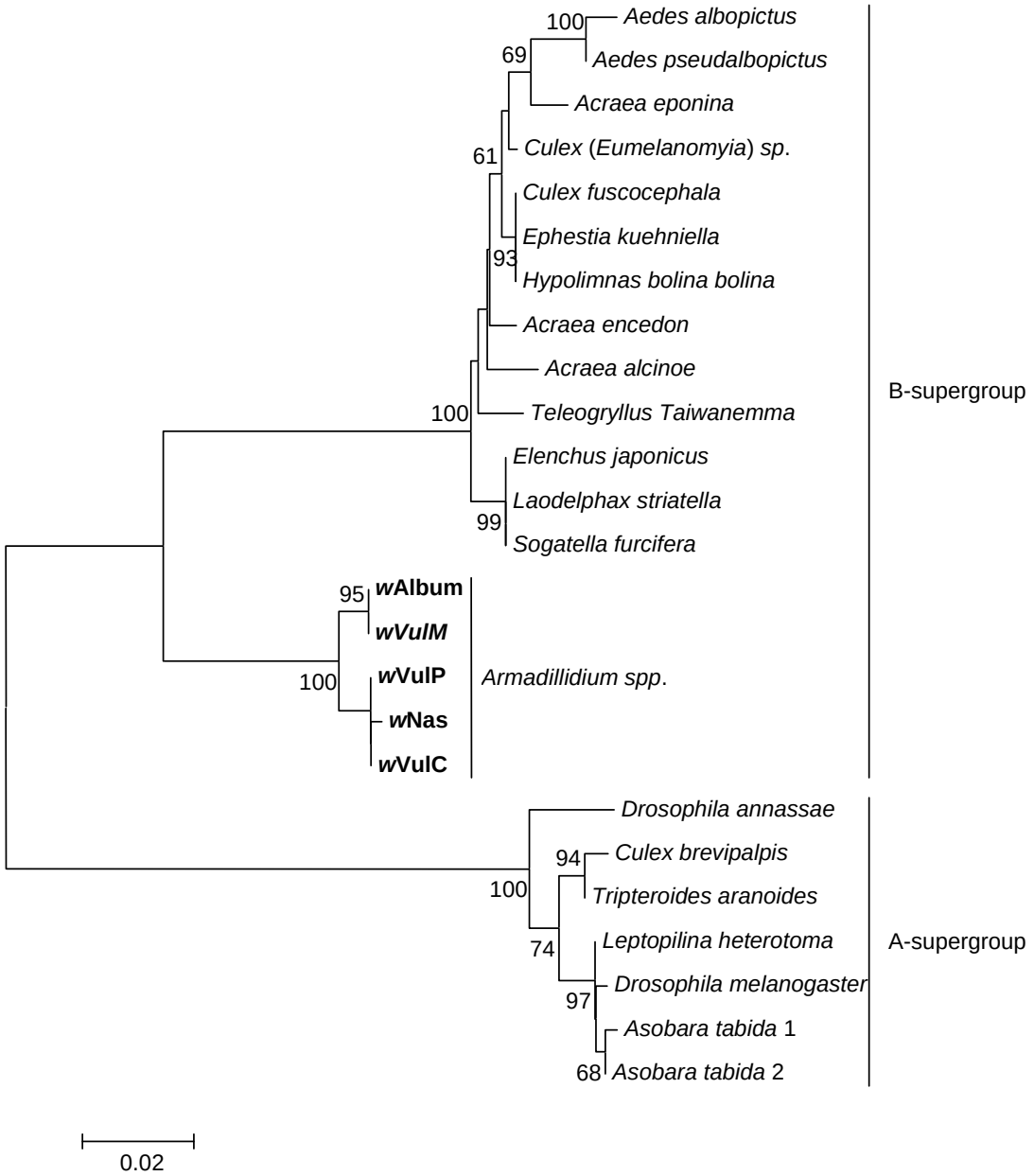


Figure III-1 Phylogenetic tree of *Wolbachia* strains based on *groE*. The tree is based on the comparison of 528 bases of the *groE* gene, using the neighbour-joining method. Numbers at the nodes are bootstrap scores. Only values higher than 50 are shown. Strains are identified by the host from which they were isolated. The five *Wolbachia* strains from *Armadillidium* species (*w*VulC, *w*VulM, *w*VulP, wNas and wAlbum) are shown in bold. Accession numbers of *groE* sequences from other arthropod symbionts are listed in Table III-2.

Table III-3 Summary of recombination analysis results using 4 methods implemented in the RDP software package: RDP, Bootscan, Chimaera and Siscan. Beginning and ending breakpoint positions are given without parentheses for sequence positions and in parentheses for the alignment positions.

Daughter	Major parent	Minor Parent	Region	Minimum Size (bp)	Method	P-Value
*w*VulP	*w*VulC	*w*VulM	502-564	61	RDP	3.380E-7
			(505-579)		BootScan	3.422E-7
					Chimaera	1.360E-5
					Siscan	1.059E-5
*w*Nas	*w*VulC	*w*VulM	803-874	70	RDP	-
			(812-884)		BootScan	1.008E-8
					Chimaera	9.607E-3
					Siscan	9.991E-4

The second recombinant fragment was found in the *w*Nas sequence by three of the methods used with lower probabilities than those of the recombinant fragment identified in *w*VulP: Bootscanning ($P < 10^{-7}$), Chimaera ($P < 10^{-2}$) and Siscan ($P < 10^{-3}$). This recombination event was not detected by the RDP method. Major and minor parents were respectively identified as *w*VulC and *w*VulM. The size of the recombinant fragment is 70 bp (1st breakpoint between positions 766 and 812 and second breakpoint between positions 884 and 931) located in the intergenic region between *wsp* and *rpoH* (see Figure III-2 and Table III-3). Excluding indels, *w*Nas is more closely related to *w*VulC (major parent) than to *w*VulM in the first 802 bases of the *wsp* sequence (respectively 99.5% and 89.3% of identity). In this region, *w*Nas differs from *w*VulC by three non-synonymous substitutions in the coding region of *wsp* (positions 433, 536 and 614, see Figure III-2 and Figure III-3) and 1 substitution in the non-coding intergenic region (position 766 of *w*Nas sequence). *w*Nas and *w*VulC sequences are identical in the last 266 bases of the alignment and differ by 1.9% of divergence from *w*VulM. In the recombinant region, *w*Nas is more closely related to *w*VulM than to *w*VulC (respectively 98.6% and 83.5% of identity). Within the *wsp* coding region, the observed divergence leads to three amino acid changes when compared to *w*VulC protein sequence (Figure III-3). No stop codon or frame shift was found in this region.

```
wVulC      301   ATGCCTATCA CTCCATACGT TGGTGTTGGT GTTGGTGCAG CATATGTAAG CAATCCTTTA
wVulP      301   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM      301   ......G.T. .......T.. .......... .......... ....CT.C.. ........C.
wNas       301   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wAlbum     301   .......... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC      361   GCAACAAAAG TTGCTGGTGA TAAAGACTCT GGATTTGGTT TTGCTTATCA AGCGAAAGCT
wVulP      361   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM      361   AGCG.TG.TA CA.T.A.A.. .C..A.A--- .......... .......... ...A......
wNas       361   GCAACAAAAG TTGCTGGTGA TAAAGACTCT GGATTTGGTT TTGCTTATCA AGCGAAAGCT
wAlbum     361   .......... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC      421   GGTGTCAGTT ATGACGTAAC TCCAGAAATC AAACTTTACG CTGGCGCTCG CTATTTTGGT
wVulP      421   .......... ..A....... .......... .......... .......... ..........
wVulM      421   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wNas       421   .......... ..A....... .......... .......... .......... ..........
wAlbum     421   .......... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC      481   TCTTATGGCG CTAACTTTGA TGGAACAAAA CAAGATCCTG CACATCCTGA TGATCTAGAG
wVulP      481   .......... .......... ....GA.... A..C.AGG.T .TGGC----- -------.CA
wVulM      481   ........T. ....G..... ....GA.... A..C.AGG.T .TGGC----- -------..A
wNas       481   .......... .......... .......... .......... .......... .....CA...
wAlbum     481   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
                                                 1
wVulC      541   AAAAAGGTTA CT------GA TAAAGGCGCA CACAAAGTTT TTTACAGTAC TATTGGTGCA
wVulP      541   G..G.A.... ..ACTACT.. .......... T.......C. .......... ..........
wVulM      541   AGCG.A.... ..ACT---.. .......... T.......C. .......... ..........
wNas       541   .......... ..------.. .......... .......... .......... ..........
wAlbum     541   .......... ..------.. .......... .......... .......... ..........
                                 wsp stop                   2
wVulC      601   GAAGCTGGAG TAGCGTTTAA TTTTTAGTCT ATCTCAGTCT TGTTATCCCA GTGGGTTTTT
wVulP      601   .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........
wVulM      601   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wNas       601   .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........
wAlbum     601   .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........

wVulC      661   CTTGTCATTC AAGTAGCATG ACACTGGGAT CTAGAAAAAA GAAATGTGAA TTCCAGTGTT
wVulP      661   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM      661   .......... .......... ........G. .......... .......... ..........
wNas       661   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wAlbum     661   .......... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC      721   TGAACACTGG AATGACACAT TGTTTATTTA AATTATAGCG TTTATTGTTA CGCGCTAGTA
wVulP      721   .......... .......... .......... .......... .....C.... ..........
wVulM      721   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wNas       721   .......... .......... .......... .......... .....C.... ..........
wAlbum     721   ....T..... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC      781   ATTTTAATCA GGTAGCTGAT GTTGAAGTGT ATTGTTGCTA AGATTTCAAT TGGATGGAAA
wVulP      781   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM      781   .......... .......... .......... .C........ ....C.T... .A....T...
wNas       781   .......... .......... .......... .C........ ....C.T... .A....T...
wAlbum     781   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
                                                 3
wVulC      841   GTTGTGCTTT TTTTAATTAA AGCTTGAATT TCTCACTAAA AATCAATATA TTATATACAT
wVulP      841   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM      841   A..A...... ...-...... .......... .T......G. ...T...... ..........
wNas       841   A..A...... ...-...... ......G... .T......G. ...T...... ..........
wAlbum     841   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
                                                                   4
                                         RpoH start
wVulC      901   GGAGTTTTAA TTTAAGTTAT TATGTTGACC CCAGTAGCGA ATTTATATGT TAATAGTAGC
wVulP      901   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM      901   .......... .......... .......... T......... ......G... ..........
wNas       901   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wAlbum     901   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

Figure III-2 Nucleic partial sequences of *wsp* gene and its 3'-adjacent region of the five *Wolbachia* strains sequenced in *Armadillidium* genus (only positions 301 to 960 of the alignment are shown). 1st position of the alignment corresponds to the 106th position of wsp gene. Codon stop is located at position 625. Heat Shock σ-factor *RpoH* locus starts at position 922. Numbers under sequence alignments correspond to breakpoints identified with DNAsp.

```
wVulC    1    SYYVRLQYNG EVLPFKTKID GIEYKKNN-D AQDPLKASFM AGSGAFGYKM DDIRVDVEGL
wVulP    1    .......... .......... ........-. .......... .......... ..........
wVulM    1    .......... .IS....... ......D.K. .......... .......... ..........
wNas     1    .......... .......... ........-. .......... .......... ..........
wAlbum   1    .......... .......... ........-. .......... .......... ..........

wVulC    60   YSQLNKNDVS GAAFTPVTVA DSVTAFSGLV NVYYDVAIED MPITPYVGVG VGAAYVSNPL
wVulP    60   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM    61   .......... ..V...A... .N........ .......... ..V....... .....F...S
wNas     60   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wAlbum   60   .......... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC    120  ATKVAGDKDS GFGFAYQAKA GVSYDVTPEI KLYAGARYFG SYGANFDGTK QDPAHPDDLE
wVulP    120  .......... .......... ....N..... .......... .......E. KQGSG----A
wVulM    121  SADTVR.QK- .......... .......... .......... ....K...E. KQGSG----.
wNas     120  .......... .......... ....N..... .......... ......... ........P.
wAlbum   120  .......... .......... .......... .......... ......... ..........
                                                                 1
wVulC    180  KKVT--DKGA HKVFYSTIGA  EAGVAFNF
wVulP    176  EE..TT.... Y......... ....V...
wVulM    176  SE..T-.... Y......... ........
wNas     180  ....--.... ......... ....V...
wAlbum   180  ....--.... ......... ....V...
                         2
```

Figure III-3 Alignment of the deduced amino acid sequences of *wsp* gene of the five *Wolbachia* strains sequenced in *Armadillidium* genus. 1st position of the alignment corresponds to the 36th position of WSP protein. Numbers under sequence alignments correspond to breakpoints identified with DNAsp on DNA sequences.

3. Intergenomic origin of recombinations

Because the same recombinant sequences were found independently in the different samples of *A. vulgare*, it is unlikely that the observed sequences are artefacts. The published *Wolbachia* genomes show two paralogs of the *wsp* gene (*wsp*B and *wsp*C). Therefore intragenomic recombination could occur between the two paralogs and the *wsp* gene (*wspA*) leading to a chimeric form of *wsp*. In order to evaluate the hypothesis of intragenomic recombination, BLAST searches of *w*Vul recombinant fragments were performed against the available *Wolbachia* genomes (*w*Mel, *w*Ana, *w*Pip, and *w*Bm). No significant alignment of the recombinant regions were found while *wspA* and *rpoH* parts of the *w*VulP sequence match respectively with the corresponding regions of *w*Mel genome (1 significant hit) and no significant matches were recorded with the corresponding *wspB* and *wspC* paralogs. These results appear to exclude an intragenomic recombination and suggest intergenic recombinations between the two different *Wolbachia* strains, *w*VulC and *w*VulM.

4. Phylogenetic analysis

Phylogenies based on *wsp*, *groE* and *ftsZ* including *Wolbachia* strains infecting other arthropods show topologies similar to those previously published on *16S rRNA*, *ftsZ* and *wsp* (Figure III-1 and III-4, see also Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001). For all genes, *Wolbachia* infecting terrestrial isopods form a monophyletic clade inside the B-supergroup.

D. Discussion

1. Evidence for recombination

Five *Wolbachia* strains have been observed to infect *Armadillidium* species: *w*VulC, *w*VulM and a new one, *w*VulP, found in *A. vulgare*, *w*Nas found in *A. nasatum* and *w*Album found in *A. album*. *wsp* sequence comparisons and statistical analysis reveal the existence of recombination between feminizing *Wolbachia* strains. Two recombinant strains (*w*VulP and *w*Nas) were identified in two different host species within the genus *Armadillidium*. In both cases, statistical analyses suggest that a small gene fragment (61 bp in *w*VulP and 70 bp in *w*Nas) of a strain closely related to *w*VulM (minor parent) has been inserted into the genome of an other strain closely related to *w*VulC (major parent). No evidence of intragenomic recombination has been found within the two *wsp* paralog genes recorded in the *Wolbachia* genomes (Foster *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004). The two recombinant strains *w*VulP and *w*Nas show only two nucleotide differences in the *wsp* and *rpoH* sequences, recombinant regions excluded. This confirms the previous work of Cordaux *et al.* (2004) suggesting that *A. vulgare* and *A. nasatum* share a common ancestral *Wolbachia* strain which constitutes the major parent of the two recombinant strains.

2. Recombination consequences on phylogenetic analysis

None of the recombination events described here confound the evolutionary relationships of *Wolbachia* strains because recombinations occurred between closely related strains of the same group (Figures III-1 and III-4) and because the recombinant fragments are too small. This is confirmed by previous results using four different genes (*16S rDNA*, *ftsZ*, *wsp* and *groE*) where *Wolbachia* infecting isopod species clustered together (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001). Moreover, due to poor alignment accuracy, the 4th HVR of *wsp,* where recombination occurs, is generally removed from phylogenetic analyses.

3. Intragenomic recombination

BLAST searches using the recombinant sequences as queries produce no significant alignment with any already known *wsp* paralogs. This confirms that an intragenomic recombination is unlikely within the feminizing *Wolbachia*. However we cannot completely exclude this possibility because the *w*Vul *wsp* paralogs are not yet known.

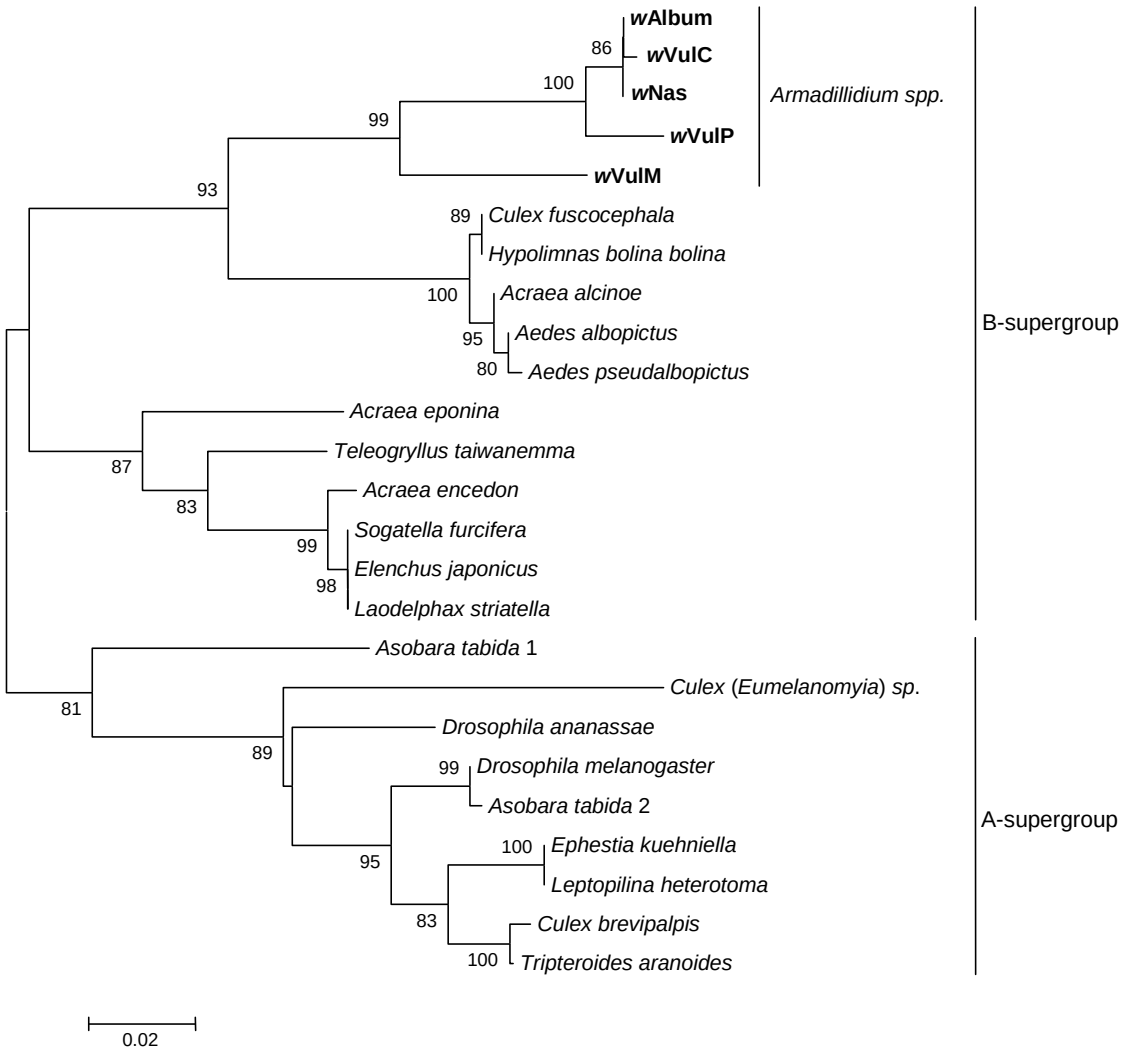


Figure III-4 Phylogenetic tree of *Wolbachia* strains based on *wsp*. The tree is based on the comparison of 528 bases of the *wsp* gene, using the neighbour-joining method. Numbers at the nodes are bootstrap scores. Only values higher than 50 are shown. Strains are identified by the host from which they were isolated. The five *Wolbachia* strains from *Armadillidium* species (*w*VulC, *w*VulM, *w*VulP, *w*Nas and *w*Album) are shown in bold. Accession numbers of wsp sequences from other arthropod symbionts are listed in Table III-2.

4. Evolutionary implications

The existence of recombinant *Wolbachia* strains in *Armadillidium* species offers new insight into the mechanisms that control genetic diversity of feminizing *Wolbachia*. A number of studies have shown multiple infections of *Wolbachia* that induce CI in insects (e.g. Vavre *et al.*, 1999; Werren *et al.*, 1995a; Werren & Windsor, 2000) and there is a growing amount of evidence indicating the existence of horizontal transfers between host species (e.g. Cordaux *et al.*, 2001; Cordaux *et al.*, 2004; van Borm *et al.*, 2003; Vavre *et al.*, 1999). As CI actively maintains multiple infections (Frank, 1998), horizontal transfers and recombination events may be favoured in such *Wolbachia* strains. The present study suggests that such

recombination events can occur in feminizing *Wolbachia*. Natural multiple infections in a single host have been demonstrated in neither *A. vulgare*, nor any other woodlouse species. As previously proposed by Cordaux *et al.* (2004) in *A. vulgare*, multi-infections are expected when horizontal transfers occur. In isopods, such horizontal transfers can occur by blood contact between wounded infected and uninfected woodlice (Rigaud & Juchault, 1995) or by the route of parasitism (parasitoid flies or phoretic mites; Cordaux *et al.*, 2001). Using experimental horizontal transfers, Bouchon *et al.* (1998) have shown that *A. nasatum* and *A. vulgare Wolbachia* strains can feminize different closely related isopod species. Rigaud *et al.* (2001) showed similar results but demonstrated that after experimental horizontal transfer, the vertical transmission of *Wolbachia* is not always successful. Moreover, *Wolbachia* horizontal transfer from *A. vulgare* to *A. nasatum* results in both effective feminisation and vertical transmission but the reverse transfer from *A. nasatum to A. vulgare* ends in both less effective feminisation and vertical transmission. This asymmetry in resulting phenotype highlights the fact that even closely related *Wolbachia* strains are adapted to their own hosts. The *Wolbachia* strain of *A. vulgare* used in the study of Rigaud *et al.* (2001) which has the same origin as *w*VulC seems less specialised than the strain of *A. nasatum*.

Due to the symbiotic life of *Wolbachia*, a short period of contact between two bacteria in a single host cell is sufficient to favour recombination. One scenario is that double infections of parental *Wolbachia* strains have occurred in one individual. Recently, simultaneous injections of two different *Wolbachia* strains in *A. vulgare* have led to stable bi-infections in the recipients for at least nine months (Johnson, pers. comm.). The strains were transmitted independently to the progeny. If there is a recombination event, this suggests that the new recombinant strain can be transmitted to the next generation, and then spread in the population.

WO-B phage element is known to recombine between different *Wolbachia* strains infecting the host (Bordenstein & Wernegreen, 2004). According to the "intracellular arena" hypothesis, WO-B phage could play a role in recombination by transferring genetic material from one strain to another within a single host. WO-B phage is also present in *w*Vul strains (Braquart-Varnier *et al.*, 2005). However no evidence of horizontal transfer of WO-B phage from a host to another has yet been found.

5. *w*VulC, an invading strain ?

Although *w*Nas is the only *Wolbachia* strain known in *A. nasatum*, this study demonstrates a genetic exchange with one strain from *A. vulgare*. Horizontal transfers are

expected between *A. vulgare* and *A. nasatum*, because they are found in the same biotopes (i.e. grass-land, gardens). On the contrary, no genetic exchange is expected with *A. album* which is a coastal species inhabiting sandy beaches and is rarely found in close contact with other woodlice species. As recombination allows the acquisition of new genetic material and potentially a new capacity to adapt to new hosts, it may help the successful colonization of non-adapted *Wolbachia* strain in an already infected host. In that respect, *w*VulC (which is potentially the major parent of the recombinant strains) seems to be spreading within the *Armadillidium* spp. hosts. This corroborates the hypothesis of Cordaux *et al.* (2004) who suggested that *w*VulC is a recent invader of *A. vulgare* populations, *w*VulM being the initial resident. The recombination observed in the *w*VulP strain could be the result of the contact between *w*VulC and *w*VulM in the same populations.

In conclusion, the discovery of recombinant *Wolbachia* strains infecting *Armadillidium* species suggests that recombination can occur in feminizing *Wolbachia* even if no evidence of multiple-infections has been shown to date. New bacterial acquisitions by horizontal transfers of *Wolbachia* seem to be frequent in *Armadillidium* species and could be a major source of *Wolbachia* genetic diversity.

E. Acknowledgements

The PhD work of Sébastien Verne is supported by a doctoral fellowship from the Région Poitou-Charentes.

We thank Daniel Guyonnet and Carine Delaunay for technical assistance. We are grateful to Laura Baldo for comments on the previous version of the manuscript.

IV. Comparaison du polymorphisme de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial : dynamique de *Wolbachia* et auto-stop génétique sur l'ADN mitochondrial

Les prévalences de *Wolbachia* sont très variables dans les populations naturelles (Juchault *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999). Les prévalences de *Wolbachia* observées sont généralement plus faibles que celles prédites par les modèles théoriques les plus simples (Bull, 1983; Hatcher, 2000; Taylor, 1990). Bien que plusieurs hypothèses ont été proposées pour les expliquer, [préférences sexuelles des mâles pour les femelles non-infectées (Hatcher, 2000; Moreau *et al.*, 2001; Randerson *et al.*, 2000), risque d'extinction accru des populations fortement infectées (Hatcher *et al.*, 1999; Hatcher, 2000; Hatcher *et al.*, 2000), compétition avec l'élément *f* (Juchault & Mocquart, 1993; Legrand & Juchault, 1984), rôle d'un complexe de gènes de résistance à la transmission de *Wolbachia* (Grandjean *et al.*, 1993; Juchault *et al.*, 1992; Rigaud *et al.*, 1999)], les prévalences de *Wolbachia* restent mal comprises. Juchault *et al.* (1993) ont proposé que les fréquences des facteurs déterminant le sexe évoluent de façon cyclique dans les populations. Comme sa transmission est maternelle, *Wolbachia* peut entrainer avec elle par auto-stop génétique l'ensemble du cytoplasme qui lui est associé, et en particulier l'ADN mitochondrial. *Wolbachia* est donc susceptible de fortement influencer la structuration génétique mitochondrial de son hôte. L'analyse de cette dernière peut donc apporter des informations sur la dynamique de *Wolbachia* dans les populations hôtes.

Rigaud *et al.* (1999) ont analysé la structuration génétique d'*A. vulgare* par RFLP sur l'ADN mitochondrial total. Contrairement à ce qui se passe chez d'autres espèces infectées par *Wolbachia* (voir Chapitre I Introduction), ils ont relevé une forte structuration génétique mitochondriale entre populations. Ils ont proposé que le polymorphisme et la structuration observés sur l'ADN mitochondrial étaient liés à l'évolution des facteurs sexuels (dont *Wolbachia*) dans les populations. Cependant, certaines hypothèses alternatives, telles que faible capacité de dispersion et/ou goulots d'étranglement démographiques n'ont pas pu être exclues. La structuration génétique nucléaire et mitochondriale d'*A. vulgare* et les prévalences de *Wolbachia* ont donc été analysées et comparées dans 13 populations naturelles afin de mieux comprendre la dynamique des prévalences de *Wolbachia*. Les marqueurs utilisés sont cinq loci microsatellites (génome nucléaire de l'hôte), un fragment du gène *Cytochrome Oxydase II* (COX2 ; génome mitochondrial de l'hôte) et le gène *wsp* (génome de *Wolbachia*). Les évènements de type démographique (goulots d'étranglement démographiques récurrents,

extinctions-recolonisations fréquentes) vont affecter à la fois les marqueurs nucléaires et mitochondriaux. Par contre, si la structuration et le polymorphisme mitochondriaux sont fortement influencés par *Wolbachia*, alors seul l'ADN mitochondrial présentera des traces de sélection.

Les prévalences de *Wolbachia* sont relativement faibles et comparables à celles observées dans les études précédentes (Juchault *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999). Cependant, *Wolbachia* est présente dans 11 des 13 populations échantillonnées. Les trois souches connues de *Wolbachia* (*w*VulC, *w*VulM et *w*VulP) ont été observées. Six populations hébergent deux ou trois souches de *Wolbachia*. *w*VulC est la souche la plus largement répandue dans les populations échantillonnées. La structuration des prévalences de *Wolbachia* n'est pas corrélée aux distances géographiques.

Les cinq loci microsatellites utilisés montrent un fort polymorphisme génétique et une faible structuration génétique ($F_{ST} = 0{,}029$) compatible avec un modèle d'isolement par la distance. Le gène *CO II* montre au contraire un polymorphisme faible (2 à 4 mitotypes par populations) et variable (diversité génique $G = 0{,}13$ à $0{,}76$) et une forte structuration génétique ($F_{ST} = 0{,}421$) incompatible avec un modèle d'isolement par la distance. Les tests de goulot d'étranglement démographique réalisés sur les données microsatellites sont significatifs dans seulement quatre populations sur treize. Les causes démographiques peuvent donc être rejetées. Par contre, les tests de Fu réalisés sur les séquences d'ADN mitochondrial sont significatifs dans toutes les populations et indiquent un déficit du nombre de mitotypes étant donné le polymorphisme nucléotidique observé. Associés au fort déséquilibre de liaison qui existe entre certains mitotypes et *Wolbachia*, ces résultats suggèrent que les facteurs féminisants sont soumis à une sélection de type fréquence-dépendante et entrainent avec eux l'ADN mitochondrial par auto-stop génétique. La structuration de l'ADN mitochondrial ne reflète donc pas uniquement les flux de gènes entre populations d'*A. vulgare*, mais aussi l'évolution des facteurs sexuels chez cette espèce.

Article préparé pour la revue *Molecular Ecology*.

Prevalence evolution of feminizing *Wolbachia* inferred from the comparison of nuclear and cytoplasmic genetic structure of its host *Armadillidium vulgare*

Authors: Verne Sébastien, Johnson Monique, Bouchon Didier & Grandjean Frédéric

Affiliation: *Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers, 40 Avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France*

* Correspondance: Université de Poitiers, Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022 POITIERS Cedex, FRANCE, phone: +33 (0)5 49 36 62 46, fax: +33 (0)5 49 45 40 15, e-mail: sebastien.verne@etu.univ-poitiers.fr

Abstract:

In *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Oniscidea) *Wolbachia* induce feminization of genetic males to improve its vertical transmission via the eggs. Because of its mode of inheritance, the spread of *Wolbachia* within and across populations is expected to influence mtDNA genetic structure by hitchhiking. In order to test the effect of *Wolbachia* on genetic diversity in *A. vulgare*, we analysed *Wolbachia* prevalence, and nuclear and mtDNA genetic structure in 13 populations of the woodlice host. Percentages of males ranged from 15% to 74% and *Wolbachia* infection levels were highly variable from one population to the next, ranging from 0 to 100% of sampled females. All three *Wolbachia* strains previously observed in *A. vulgare* were present (*w*VulC, *w*VulM and *w*VulP) with *w*VulC being the most prevalent (9 out of 13 populations). A significant genetic structure compatible with isolation by distance was observed on the five used microsatellites loci. The strong genetic structure observed on mtDNA is correlated with *Wolbachia* prevalence structure. High linkage disequilibrium was found between the three observed strains of *Wolbachia* and mtDNA. Neutrality tests on

mtDNA polymorphism indicate a pattern compatible with frequency-dependant selection. *Wolbachia* and other sex ratio factors thus seem to be under frequency-dependant selection and induce hitchhiking on mtDNA.

A. Introduction

Mitochondrial DNA is often used in population genetic studies because it is easy to use and it is generally considered to be a good marker to study the phylogeographic history of a given species or to infer female gene flow. Moreover, the comparison of mtDNA and nuclear genetic structure can lead to the study of sex bias dispersion and to the determination of the more phylopatric sex. There are now many examples of population genetic studies that compare mtDNA and nuclear genetic structure to infer sex bias dispersion (e.g. Girman *et al.*, 2001; Scribner *et al.*, 2001; Seielstad *et al.*, 1998; Tiedemann *et al.*, 2004) including arthropods studies (i.e. Gyllenstrand & Seppä, 2003; Hurwood *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 1999; Salvato *et al.*, 2002). However, it is now well known that inherited symbionts (i.e. non neutral cytoplasmic factors, including *Wolbachia*, *Microsporidia*, *Rikettsia* and *Spiroplasma*) can alter the mtDNA genetic diversity and structure by hitchhiking (see Hurst & Jiggins, 2005 for a review). Such a situation is found, for example, in *Drosophila simulans* or in *Porcellionides pruinosus*. In both cases, the rapid spread of the reproductive parasite *Wolbachia* dramatically reduced mtDNA polymorphism (Ballard & Kreitman, 1994; Ballard *et al.*, 1996; Ballard, 2000a; Dean *et al.*, 2003; Marcadé *et al.*, 1999). Many other studies have shown similar effects of the spread of *Wolbachia* on mtDNA polymorphism in other species (i.e. Dyer & Jaenike, 2004; Jiggins, 2003; Johnstone & Hurst, 1996; Schulenburg *et al.*, 2002; Shoemaker *et al.*, 1999; Shoemaker *et al.*, 2004). *Wolbachia* is estimated to infect between 20 and 73% of arthropods (Bouchon *et al.*, 1998; Breeuwer & Jacobs, 1996; Goodacre *et al.*, 2006; Jeyaprakash & Hoy, 2000; Werren & Windsor, 2000). As a consequence, it is important to take into account the possible effects of cytoplasmic factors on mtDNA in population genetic studies.

The comparison of neutral nuclear genetic markers and mtDNA can enable the detection of selection pressure on the associated cytoplasmic factors. Neutral markers are expected to follow a model of isolation by distance, whereas non neutral markers are not expected to follow such a model if selection pressures differ between populations. As a consequence, before inferring gene flow and dispersion patterns in a given species it is important to know if factors such as selective pressure or endosymbionts like *Wolbachia* are

present and what may be their effects on the genetic structure of their hosts. A non neutral marker (under selection or linked to a selected gene) is expected to show a distinct polymorphism pattern as compared to that of a neutral marker. Such patterns can be tested with Tajima's test (Tajima, 1989) or Fu's test (Fu, 1997), among others.

The terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* is a good and original model to test the effect of *Wolbachia* on genetic structure. This species exhibits a polymorphism of infection (two strains *w*VulC and *w*VulM and the variant *w*VulP (Cordaux *et al.*, 2004; Verne *et al.*, 2007), as well as a relatively high mtDNA polymorphism (Rigaud *et al.*, 1999). In *A. vulgare*, *Wolbachia* inverts genetic males into functional females. The strains *w*VulC and *w*VulM are feminizing strains and they seem to exhibit different life history traits and consequently different evolutionary strategies (Cordaux *et al.*, 2004). The phenotype of *w*VulP is unknown but it is suspected to be feminizing as well. Another feminizing factor labelled *f* of unknown origin (Juchault & Mocquart, 1993), is known in *A. vulgare*. Although both *f* and the intracytoplasmic *Wolbachia* can lead to female-biased sex ratios in the wild, they do not have identical patterns of transmission. *Wolbachia* is maternally transmitted, wheras *f*, a non-Mendelian genetic element, undergoes a partial amount of paternal transmission, mainly due to the selection of host autosomal genes repressing the feminizing effect of *f* (Rigaud *et al.*, 1999). In natural populations, two such autosomal resistance genes are observed; a masculinizing gene and a complex of resistance genes. The masculinizing gene "*M*" is able to restore male phenotype in the presence of the *f* element but not in the presence of *Wolbachia* (Rigaud & Juchault, 1993). In the latter case, the masculinizing gene leads to female biased progenies of *Wolbachia*-infected females. The complex of resistance genes "*r*" interrupts the vertical transmission of *Wolbachia* to the progeny but has no effect on *f*. Natural populations are mainly composed of neo-females (genetic males having been converted into functional females) due to the presence of sex ratio distorters (*f*, *Wolbachia*). Indeed, only one out of 30 populations in temperate European regions contains solely genetic females (Juchault *et al.*, 1993).

In a previous study, Rigaud *et al.* (1999) analysed mtDNA and sex ratio distorters in French populations of *A. vulgare*. Their results revealed a strong mtDNA structure, a result for which they proposed three non exclusive hypotheses: the effects of maternally inherited sex ratio distorters, a low dispersal capacity and/or strong population bottlenecks. In order to further our understanding of genetic structure in *A. vulgare,* a comparison of a mtDNA marker with one or several nuclear genetic markers should be undertaken.

Thus, in the present study, mitochondrial and nuclear genetic diversity were examined in populations of *A. vulgare* along a close to 100 km long transect and an attempt was made to examine *Wolbachia* prevalence, genetic diversity in *A. vulgare* and to determine the role of *Wolbachia* and other sex factors in the genetic structure of its host.

B. Materials and Methods

1. Sample collection

13 populations were sampled along a transect of 97 km from Ensoulesse (north-east of Poitiers) to Villeneuve (south-west of Niort) in France (Figure IV-1). Sample sizes are summarized in Table IV-1. In all 400 specimens were collected (240 females and 160 males). Departure in percentage of males from 50% was tested using replicated Goodness-of-fit tests as presented by Sokal and Rohlf (1995).

2. Molecular biology techniques

Total genomic DNA was extracted from ovaries and neural tissues using a phenol-chloroform protocol (Kocher *et al.*, 1989). Total genomic DNA concentrations were homogenized to 30 ng/ µl.

***Wolbachia* detection :** Presence of *Wolbachia* was tested by PCR amplification of the *wsp* region (≈ 580 bp) in each individual (160 males and 240 females in total) using *wsp* 81F and *wsp* 691R primers, as described in Michel-Salzat *et al.* (2001). DNA concentrations were homogenized to 60ng per PCR reaction (final volume of 25 µl). The identification of *Wolbachia* strains in the studied populations was checked by sequencing the *wsp* gene in all infected specimens as described in Cordaux *et al.* (2004). Sequences were deposited in Genbank under accession numbers: DQ778095-DQ778107.

Amplification of microsatellites: Five polymorphic microsatellite loci (*Av1*, *Av2*, *Av5*, *Av6* and *Av8*) were used in the present study to assess nuclear genetic variation in *A. vulgare* (Verne *et al.*, 2006). All experimental procedures for microsatellite genotyping were strictly identical to those described in Verne *et al.* (2006). 268 individuals (110 males and 158 females) from the 13 populations were fully genotyped at the five loci. A minimum of 18 and a maximum of 24 individuals were genotyped from each population (Table IV-3), these numbers being a function of the number of specimens collected at each site.

mtDNA sequence: 169 females of the 240 sampled were randomly chosen and their mtDNA sequenced. To this end, a region of ~1550 bp was amplified using primers 5f4 (5'-GCACCACATCACGCCATCATT) and 5r3 (5'-GCTTTACCCTCACTTCGGCTT) (Marcadé

et al., unpublished). The temperature cycling was 95°C for 3 min.; then 40 cycles of 95°C for 45 sec., 55°C for 45 sec., and 72°C for 100 sec.; and finally a single cycle at 72°C for 15 min. We sequenced a 610-615bp fragment of mtDNA comprising the 3'- part of *COX2* gene (354bp) and its 3' adjacent region (256-261 bp) using the internal primer CO2dir (5'-GAGAGYCCYATCCTTGAAGAAG). Sequences were checked using the 5r3 reverse primer. An *Armadillidium maculatum* sequence (laboratory strain) was used as an outgroup. DNA sequences were aligned manually with Bioedit (Hall, 1999). All sequences were deposited in Genbank under accession numbers: EF519916-EF519952.

3. Within population diversity

Microsatellites: The allelic richness, which corrects the observed number of alleles for differences in sample size, was computed by the rarefaction method using HP-Rare (Kalinowski, 2004; Kalinowski, 2005). The observed heterozygosity (H_O) and unbiased expected heterozygosity (H_E) (Nei, 1978) were computed with GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Differences between populations in allelic richness and H_E were assessed using Friedman's test. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were tested using the exact probability test of Guo & Thompson (1992) available in GENEPOP 3.2a (Raymond & Rousset, 1995). Significance levels were calculated at each locus for each population, and over all loci for each population. Genotypic linkage disequilibrium between each pair of loci was estimated by Fisher's exact tests. Tests for both deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were performed using Markov chains (10000 dememorization steps, 100 batches, 5000 iterations/batch).

Mitochondrial DNA: Mitotype number, effective mitotype number and Nei's (1987) gene diversity corrected for sample size (which is equivalent to expected heterozygosity of microsatellite loci) were calculated with GENODIVE software (Meirmans & Van Tienderen, 2004). Nucleotide diversity (π_n), defined as the average number of pairwise nucleotide differences per site (Nei & Li, 1979), and θ (=2Nμ, where N is the effective population size and μ is the mutation rate), which is based on the number of segregating sites (Nei, 1987; Watterson, 1975), were calculated using the program DnaSP (Rozas & Rozas, 1999). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of observed mitotypes were conducted using MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Genetic distances between mitotypes were estimated using Kimura's two parameter model (Kimura, 1980). These distances were used to construct a phylogenetic tree according to the Neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). Bootstrap analyses (1000 replicates) were performed to determine the robustness of the tree.

Linkage disequilibrium between mtDNA and infection status was measured using *D'* statistic (Lewontin, 1964). Exact test of linkage disequilibrium was performed across the entire sample (n=171 genotypes) using Arlequin software (Excoffier *et al.*, 2005). Markov chain was set with default parameters (50,000 dememorization steps, Markov chain of 100,000 steps).

4. Neutrality tests

Genetic diversity can be influenced by several factors including selection pressure and *Wolbachia* hitchhiking, which should not affect microsatellites, and drastic reductions in population size, which should affect both mitochondrial and nuclear genetic diversities.

Microsatellites: We tested the population bottleneck hypothesis using two methods implemented in Bottleneck software v1.2.02 (Piry *et al.*, 1999): the "sign test", (Cornuet & Luikart, 1996) and the "Wilcoxon sign-ranks test" (Luikart & Cornuet, 1998). Three mutation models were tested: Infinite Allele Model (IAM), one-step Stepwise Mutation Model (SMM) and Two Phase Model (TPM) with 95% single step mutations and 5% multiple-step mutations.

Mitochondrial DNA: In order to test deviations from neutrality, Tajima's test (Tajima, 1989), Fu and Li's test (Fu & Li, 1993) and Fu's Fs test (Fu, 1997) were performed for each population using NeutralityTest software (http://www.hgc.sph.uth.tmc.edu/neutrality_test/; Li & Fu, submitted). The first test compares estimates of the number of segregating sites and the average number of nucleotide differences that are correlated under the neutral model. Selection, hitchhiking or population size variations produce deviations in the correlations between these two parameters. The second test compares the number of external mutations with nucleotide diversity. The third test compares the observed number of alleles and the expected number of alleles given the observed number of pairwise differences, taken as an estimator of θ. Although it was primarily designed to detect an excess of haplotypes given the number of mutations (Fu, 1997), we used it here to detect a deficit of haplotypes.

5. Genetic structure

Genetic differentiation: Genetic differentiation between populations was estimated using pairwise F_{ST} estimates according to Weir & Cockerham (Weir & Cockerham, 1984) as implemented in the GENETIX program 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Due to a limited number of both loci and individuals, F_{ST} was preferred over R_{ST} as a measure of genetic differentiation (Gaggiotti *et al.*, 1999; Rossiter *et al.*, 2000). Significance of pairwise F_{ST} was tested with GENETIX's permutation procedure using 10000 permutations. Estimates of mtDNA

differenciation between pairs were calculated by taking into account (φ_{ST}) or by not taking into account (F_{ST}) mitotype divergence using Arlequin software (Excoffier *et al.*, 2005). AMOVA were successively performed with Arlequin software (Excoffier *et al.*, 2005) on microsatellite data, mitochondrial DNA and *Wolbachia* genetic structures.

Isolation by distance: Mantel tests and partial Mantel tests were performed to discriminate between the effects of isolation by distance and the effects of *Wolbachia* on microsatellite and mtDNA genetic structures. F_{ST} and φ_{ST} were respectively transformed in $F_{ST}/(1-F_{ST})$ and $\varphi_{ST}/(1-\varphi_{ST})$ according to Rousset (1997). The program FSTAT (Goudet, 1995; Goudet, 2001) was used to estimate the correlation among the matrices of genetic distances based on mitochondrial marker, microsatellite loci, *Wolbachia* prevalence and the matrix of log-transformed geographic distances.

C. Results

1. Within locality diversity

Observed percentage of males ranged from 15% to 74% (Table IV-1 and Figure IV-1). Replicated goodness-of-fit test indicated a percentage of males significantly different from 50% for the whole sample ($G_T = 16.11$; $df = 1$; $P = 6.10^{-5}$), but with significant heterogeneity between samples ($G_H = 35,25$; $df = 12$; $P = 0,0004$) and a percentage of males significantly lower than 50% when samples were pooled (40% of males ; $G_P = 16,11$; df = 1 ; $P = 6.10^{-05}$). After Bonferroni corrections, only the population St Maixent showed a percentage of males significantly lower than 50% in the sample (15%). One uninfected female intersex was found in the population of Chizé. Such intersex individual can be the product of incomplete feminization by the *f* element (Legrand & Juchault, 1969).

***Wolbachia* diversity:** *Wolbachia* were found to be present in 11 of the 13 sampled populations and exhibited infection levels that were highly variable from one population to the next, ranging from 0 to 100% of sampled females and from 0 to 63% when all sampled individuals are considered (Table IV-1 and Figure IV-1). Only 4 of the *Wolbachia*-containing populations exhibited infection levels that were above 50% in sampled females. *wsp* sequence analyses revealed that all three *Wolbachia* strains previously observed in *A. vulgare* were present (*w*VulC, *w*VulM and *w*VulP) and that these were identical to previously published sequences of these strains (Cordaux *et al.*, 2004; Verne *et al.*, 2007). *w*VulC was the most prevalent (9 out of 13 populations), followed by *w*VulM (6 out of 13 populations) and finally

*w*VulP (2 populations). One population contained all three strains, 5 contained 2 strains and another 5 contained only one of the three strains.

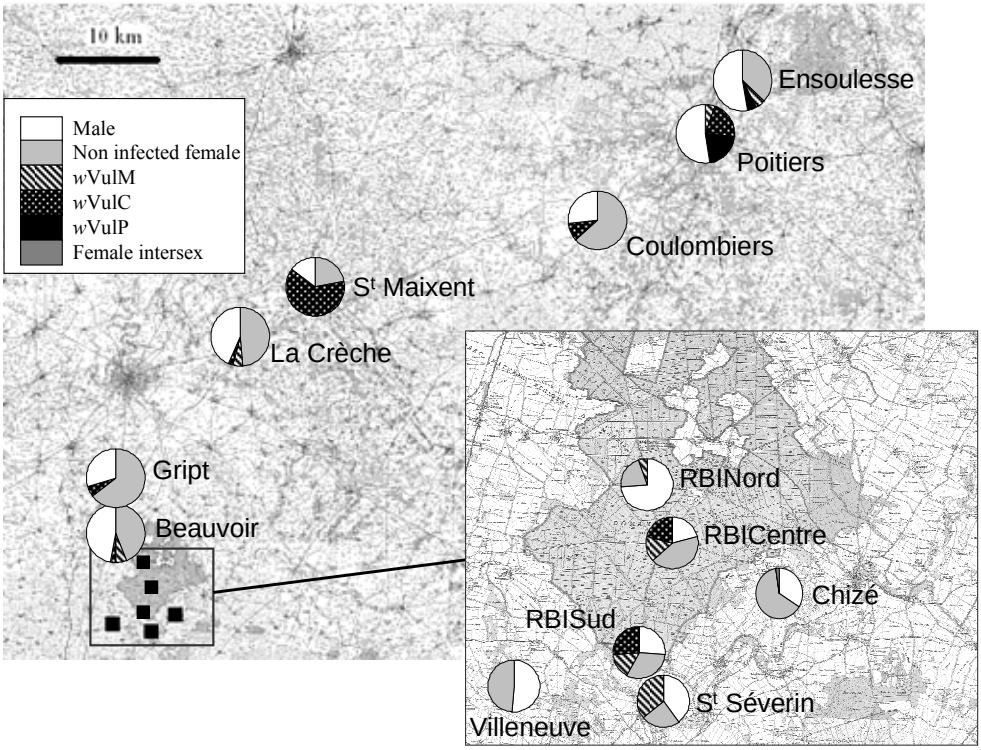


Figure IV-1 *Wolbachia* prevalence in 13 populations of *Armadillidium vulgare*. One unifected intersex was observed in the Chizé population.

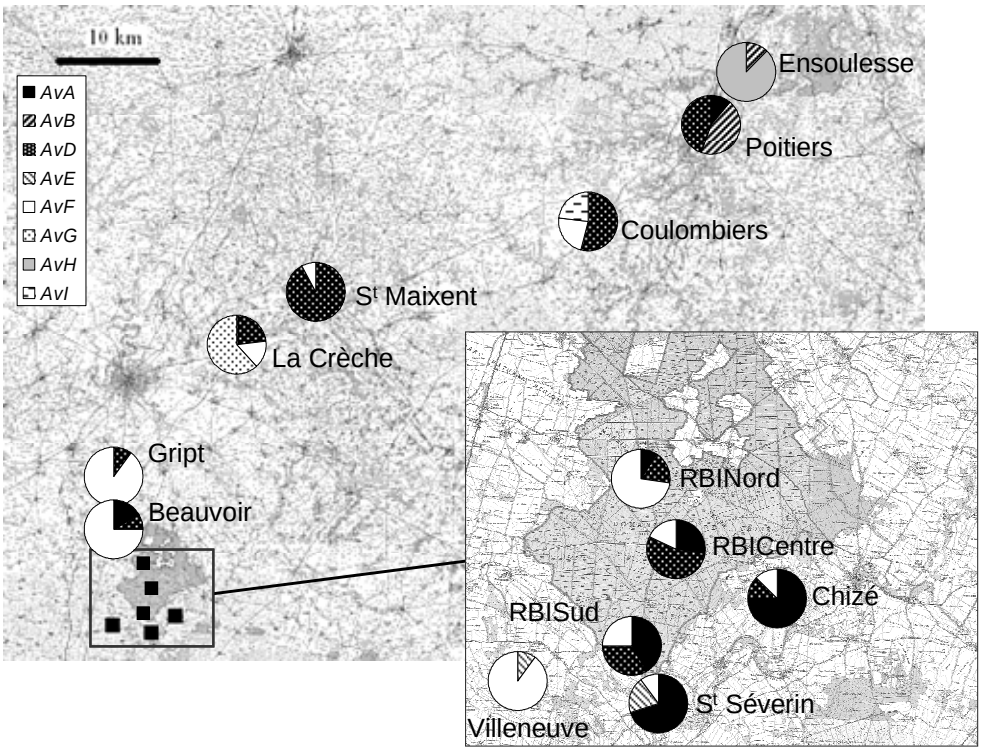


Figure IV-2 Mitotype distribution in 13 populations of *Armadillidium vulgare*. Only females were genotyped.

Table IV-1 Sex ratio and *Wolbachia* prevalence in studied populations. Sample size of collected individuals in the field (N), percentage of males, probability of goodness-of-fit test of biased percentage of males (*G*), and *Wolbachia* prevalence on the whole samples are given. Bold value for the *G* test indicates significant result after Bonferroni correction for 13 simultaneous tests.

Population	*N*	% of males	*P*(*G*)	*Wolbachia* prevalence in whole populations			
				*w*VulC	*w*VulM	*w*VulP	All
RBINord	19	0.74	0.038	1	-	-	1
RBICentre	18	0.50	1	2	-	-	2
RBISud	19	0.26	0.038	3	5	-	3
Villeneuve	47	0.51	0.885	-	-	-	-
St Séverin	35	0.40	0.239	-	14	-	14
Chizé	46	0.35	0.039	-	-	-	-
Beauvoir	34	0.47	0.733	1	2	-	3
Gript	34	0.29	0.016	2	1	-	3
La Crèche	39	0.44	0.426	1	2	-	3
St Maixent	41	0.15	**$< 10^{-5}$**	26	-	-	26
Coulombiers	30	0.27	0.010	3	-	-	3
Poitiers	19	0.58	0.496	3	1	4	8
Ensoulesse	19	0.53	0.821	-	1	1	2
Whole sample	400	0.40		42	26	5	73

mtDNA diversity: Based on *COX2* sequences, eight mitotypes were found in the studied populations of *A. vulgare* (Figure IV-2). Mitotype divergence ranged from 0.16 to6.15% (mean 3.78%) in the studied populations. Mitotype diversity, however, was low (Table IV-2). In all, 8 mitotypes were found. Phylogenetic relationships show a high divergence between the more distant mitotypes (Figure IV-3). However, mitochondrial gene diversity is not equally distributed between populations (Table IV-2). 2 to 4 mitotypes were observed in each population. Nei's gene diversity and effective mitotype number are highly variable, respectively ranging from 0.13 to 0.76 and from 1.14 to 3.31. θ and π_n are also variable, ranging respectively from 0.010 (Gript) to 0.022 (Coulombiers) and from 0.005 (St Maixent) to 0.030 (Coulombiers).

Table IV-2 Within population mtDNA polymorphism analysis. *N*, sample size ; *M*, mitotype number ; M_{eff}, effective mitotype number ; G_{Nei}, corrected gene diversity ; θ (per site) ; π_n, nucleotide diversity ; D_{Taj}, value of Tajima's test of neutrality (Tajima, 1989) ; *Ds*, statistic of Fu and Li's test ; statistic of Fu's test (Fu, 1997). * and * indicate significant values (respectively at 1% and 5% probability level) after sequential Bonferroni corrections for 13 simultaneous tests.**

	N	*M*	M_{eff}	G_{Nei}	θ	π_n	Tajima's *D*	Fu and Li's *Ds*	Fu's *Fs*
RBINord	5	2	1.47	0.40	0.0157	0.0131	-1.059	-1,059	6.203 *
RBISud	13	4	3.31	0.76	0.0191	0.0188	0.580	1,469 *	9.572 *
RBICentre	15	3	2.27	0.60	0.0116	0.0133	-0.067	-0,052	8.183 *
Villeneuve	15	2	1.14	0.13	0.0142	0.0061	-2.202 ***	-3,041 ***	7.643 *
St Sevenin	14	3	1.56	0.38	0.0171	0.0122	-1.151	-0,514	8.440 *
Chizé	16	4	2.25	0.59	0.0178	0.0127	-1.126	-0,322	7.135 *
Beauvoir	16	3	1.91	0.51	0.0113	0.0159	1.476	1,478 *	11.222 ***
Gript	16	2	1.28	0.23	0.0104	0.0081	-0.846	1,464 *	9.517 *
La Creche	15	3	1.99	0.53	0.0111	0.0126	0.514	1,463 *	9.100 *
St Maixent	15	2	1.14	0.13	0.0106	0.0046	-2,156 *	-2,962 ***	6.194 *
Coulombiers	14	3	2.65	0.67	0.0216	0.0290	1.344	1,524 ***	14.953 ***
Poitiers	9	3	1.59	0.42	0.0164	0.0149	-0.434	-0,699	6.246 *
Ensoulesse	8	3	2.46	0.68	0.0199	0.0132	-0.053	0,925	8.229 *

Microsatellite diversity: Microsatellite genetic diversity was high in all populations and exhibited low variability among populations (Table IV-3). Allelic richness and expected heterozygoty ranged respectively from 6.88 to 8.77 and from 0.68 to 0.80. No significant differences in expected heterozygoty and allelic richness were found between populations (Friedman's Test, respectively $P = 0.0668$ and $P = 0.1553$). No significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium was detected. However, *Fis* values were globally positive (only one negative value in the Coulombiers population), and may suggest the existence of null alleles at low frequencies in the majority of the populations. No significant linkage disequilibrium between loci was detected.

Table IV-3 Microsatellite polymorphism within populations: sample size (*N*), estimated number of alleles after rarefaction (N_A), observed and expected heterozygosities (H_o and H_e), F_{IS} value.

Population	*N*	N_A	H_o	H_e	F_{IS}
RBINord	19	8.06	0.68	0.76	0.101
RBICentre	19	7.86	0.76	0.77	0.020
RBISud	18	8.20	0.71	0.80	0.111
Villeneuve	23	8.77	0.76	0.78	0.025
St Séverin	23	8.58	0.72	0.79	0.086
Chizé	21	8.70	0.78	0.77	0.004
Beauvoir	20	8.10	0.73	0.76	0.044
Gript	20	7.72	0.66	0.74	0.114
La Crèche	20	7.37	0.65	0.71	0.084
St Maixent	24	7.85	0.69	0.69	-0.003
Coulombiers	21	7.93	0.74	0.72	-0.036
Poitiers	19	6.88	0.67	0.68	0.006
Ensoulesse	19	8.02	0.68	0.72	0.050

2. *Wolbachia*-mtDNA linkage disequilibrium

Significant linkage disequilibrium was found between *Wolbachia* infection status and mtDNA (exact test of linkage disequilibrium, $P < 10^{-5}$). Distribution of mitotypes according to the sampling location and the infection status of females are shown in supplementary Table IV-9. *w*VulP is associated only with mitotype AvB ($D' = 1$). *w*VulC and *w*VulM are both associated with several mitotypes. However, both strains are mainly associated with one mitotype: 18 of 21 *w*VulM infected females show AvA mitotype ($D' = 0.82$) and 30 of 32 *w*VulC infected females show AvD mitotype ($D' = 0.91$). All mitotypes, with the exception of AvB, were found associated with uninfected females.

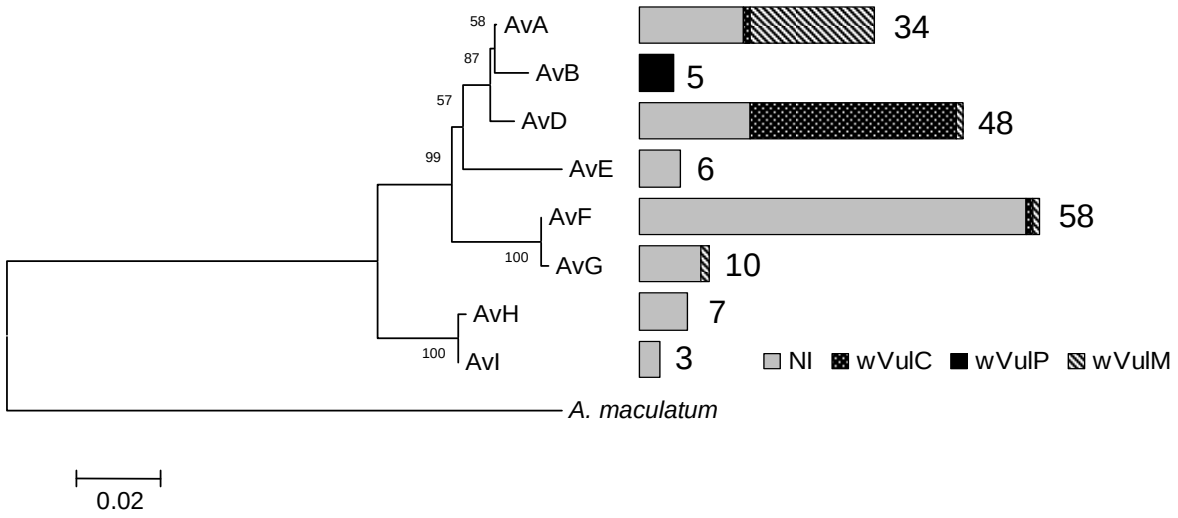


Figure IV-3 Phylogenetic relationships of 8 mitotypes of *Armadillidium vulgare*, inferred from the Cytochrome Oxydase II region by the Neighbour-joining method (Saitou, Nei, 1987). Bootstrap values (1000 replicates) are indicated above nodes. Frequencies of associated infection status are shown on the right. Numbers indicate the observed number of females for each mitotype. NI = non infected.

3. Neutrality tests and bottleneck detection

Microsatellites: We employed the "sign test", (Cornuet & Luikart, 1996) and the "Wilcoxon sign-rank test" (Luikart & Cornuet, 1998) for heterozygosity excess to test if microsatellite allele distributions within populations had been perturbed by changes in population size. Only Wilcoxon tests show a significant excess of gene diversity with the IAM in four populations: RBINord, RBICentre, RBISud and Chizé.

mtDNA: Neutral evolution of mtDNA was tested in each population using Tajima's *D* test (Tajima, 1989), Fu and Li's *Ds* test (Fu & Li, 1993) and Fu's *Fs* test (Fu, 1997) (Table IV-2). After Bonferroni corrections, significant *D* values were detected in 2 populations. Both Villeneuve and St Maixent populations showed significant excess of rare mutations. Fu and Li's *Ds* tests gave similar results to Tajima's *D* test, although seven populations showed significant departure from neutrality. Villeneuve and St Maixent populations showed

significant excess of recent mutations and RBISud, Beauvoir, Gript, La Crèche and Coulombiers exhibited a deficit of recent mutations. According to Fu's *Fs* test after Bonferroni corrections, all the studied populations showed a significant allele deficit.

4. Population differentiation

***Wolbachia* prevalence structure:** *Wolbachia* prevalence ranged from 0 to 100% of females. The analysis of geographic structure of *Wolbachia* strain prevalence using F-statistics revealed a highly significant structure. Pairwise F_{ST} values ranged from -0.041 to 0,642 (supplementary Table IV-6). 18 of the 78 pairwise F_{ST} values were significant after sequential Bonferroni corrections at the 5% level (38 significant values before Bonferroni corrections). Respectively, 10 and 5 of the 18 significant pairwise *Fst* values concern the populations of St Maixent and St Séverin, both of which are highly infected by one *Wolbachia* strain (*w*VulM and *w*VulC respectively at a prevalence of 0.74 and of 0.67,). AMOVA performed on *Wolbachia* prevalence showed 30.85% of genetic variance among populations (Table IV-4).

Table IV-4 Analysis of Molecular variance results. 4 AMOVA were conducted on allele frequencies for microsatellite data, infection status, mitotype frequencies and the combination of infection status and mitotype frequencies. 1 AMOVA was conducted on mtDNA with pairwise distances between mitotypes. φ_{ST} and F_{ST} were calculated respectively with and without taking into account allele/mitotype distances. *P* indicates the probability that estimates of φ_{ST} and F_{ST} do not differ from zero, 10000 permutations.

	Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	
Micro-satellites	Among populations	12	47.67	0.053	2.85	$F_{ST} = 0.028$ $P < 0.0005$
	Within populations	519	938.07	1.807	97.15	
	Total	531	985.74	1.860		
Infection status	Among populations	12	14.97	0.081	30.85	$F_{ST} = 0.308$ $P < 0.0005$
	Within populations	158	28.84	0.183	69.15	
	Total	170	43.81	0.264		
ADN mitochondrial (haplotype frequencies)	Among populations	12	28.87	0.166	42.19	$F_{ST} = 0.421$ $P < 0.0005$
	Within populations	158	36.04	0.229	57.81	
	Total	170	64.91	0.395		
ADN mitochondrial (pairwise distances)	Among populations	12	673.82	3.930	45.29	$\varphi_{ST} = 0.453$ $P < 0.0005$
	Within populations	158	750.11	4.750	54.71	
	Total	170	1423.94	8.680		

Microsatellites: A significant but low microsatellite genetic structure was found. Pairwise F_{ST} values ranged from -0.004 to 0.083 (supplementary Table IV-8). 35 of 78 F_{ST} values are significant after Bonferroni correction (supplementary Table IV-8). AMOVA based on microsatellite loci supports this low but significant structure with a global F_{ST} = 0.0285 ($P < 0.0005$; Table IV-4).

mtDNA: mtDNA showed strong and significant genetic structure based both on mitotype frequencies only and when mitotype divergence is taken into account. Pairwise F_{ST} and pairwise φ_{ST} ranged respectively from -0.083 to 0.858 and from -0.108 to 0.830 (supplementary Table IV-7). 48 of the 78 pairwise F_{ST} and 35 of the 78 pairwise φst are significant after Bonferroni corrections. AMOVA based on mitotype frequencies and mitotype divergence gave similar results, with $F_{ST} = 0.421$ ($P < 0.0005$) and $\varphi_{ST} = 0.453$ ($P < 0.0005$), respectively.

Isolation by distance: To identify factors that can influence genetic structure of the different analysed markers (*Wolbachia*, mtDNA, nuclear DNA), we performed simple and partial Mantel tests. Results are summarized in Table IV-5. Simple Mantel tests showed a highly significant correlation between microsatellite structure and geographic distance ($r^2 = 30.8\%$). This pattern is compatible with isolation by distance. Although partial Mantel tests showed a significant correlation with *Wolbachia* prevalence, the explained variance by both geographic distance and *Wolbachia* prevalence structure ($r^2 = 34.6\%$) is not very different from that explained by geographic distance alone. This suggests that *Wolbachia* has only a slight effect on nuclear genetic structure and microsatellites seem to follow a model of isolation by distance. Thus, pairwise F_{ST} based on microsatellite loci are assumed to

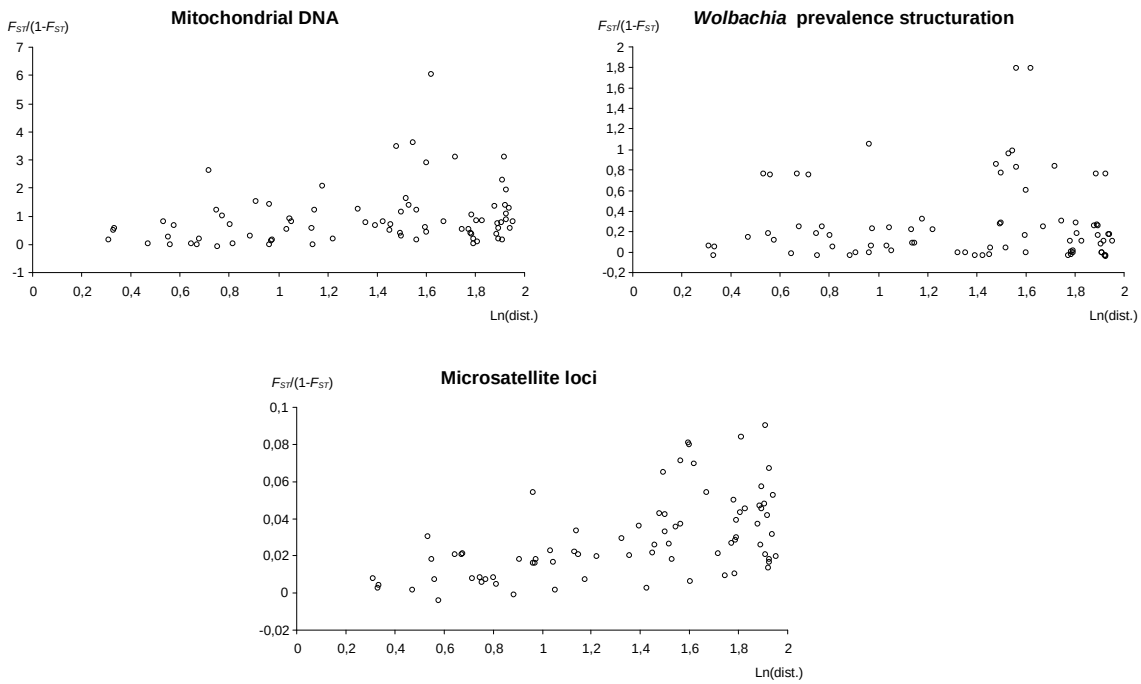


Figure IV-4 Plots of genetic structure indices based on Cytochrome Oxydase II, microsatellite loci and *Wolbachia* prevalences against log-transformed geographic distances.

Table IV-5 Simple and partial Mantel test results. (Partial) regression coefficient β, associated probability $P(\beta)$ and explained variances (r^2) are shown for each test. Gene flow corresponds to the $F_{ST}/(1-F_{ST})$ distance based on microsatellite loci. *Wolbachia* corresponds to the $F_{ST}/(1-F_{ST})$ distance based on *Wolbachia* prevalence. High. Sign. = highly significant probability.

Dependant variable	Explanatory variable	Controlled variable	β	$P(\beta)$	r^2
Microsatellites (gene flow)	Geographic distance		0.024	High. sign.	0.308
	Wolbachia		0.009	0.500	0.100
	Geographic distance	*Wolbachia*	0.022	0.010	0.346
	Wolbachia	Geographic distance	0.006	0.084	
mtDNA (only mitotype frequencies)	Geographic distance		0.492	0.034	0.058
	Wolbachia		1.275	High. sign.	0.859
	Gene flow		10.187	0.052	0.048
	Geographic distance	*Wolbachia*	0.065	0.795	0.860
	Wolbachia	Geographic distance	1.265	High. sign.	
	Gene flow	*Wolbachia*	-3.881	0.486	0.865
	Wolbachia prevalence	Gene flow	1.311	High. sign.	
mtDNA (taking account of mitotype divergences)	Geographic distance		0.552	0.032	0.059
	Wolbachia		1.204	0.000	0.619
	Gene flow		3.244	0.586	0.004
	geographic distance	*Wolbachia*	0.154	0.572	0.624
	Wolbachia	Geographic distance	1.181	High. sign.	
	Gene flow	*Wolbachia*	-10.752	0.084	0.658
	Wolbachia	Gene flow	1.304	High. sign.	
Wolbachia	Geographic distance		0.337	0.043	0.051

represent gene flow between populations and are used in simple and partial Mantel tests to test the influence of gene flow on mtDNA structure and on *Wolbachia* prevalence. No clear evidence for an influence of either gene flow or geographic distance on mtDNA structure was found. Indeed, less than 6% of variance is explained by the model (both for F_{ST} and φ_{ST}), thus suggesting that there is only a very small influence of geographic distance on mtDNA structure. On the other hand, the tests are concordant with a strong correlation between *Wolbachia* prevalence structure and mtDNA structure (based on both F_{ST} and φst). Therefore, isolation by distance was observed for the microsatellite data but not for the mtDNA.

D. Discussion

Results indicate high microsatellite genetic diversity and a low number of divergent mitotypes within each population. No traces of demographic bottlenecks were found in seven of thirteen sampled populations. High linkage disequilibrium was found between some mitotypes and *Wolbachia*, indicating a possible hitchhicking between them. Neutrality tests on mtDNA polymorphism indicate a pattern compatible with frequency-dependant selection.

1. Diversity and prevalence of *Wolbachia*

Infection levels ranged from 0 to 100%, with 11 populations out of 13 harbouring *Wolbachia*. This bacterial prevalence is higher than has been found in previous studies of *A. vulgare* populations. Indeed, Rigaud *et al.* (1999) observed *Wolbachia* in 3 out of 10 populations whereas Juchault *et al.* (1993) found the bacteria in only 6 out of 31 populations. Cordaux *et al.* (2004) have found 16 out of 20 populations harbouring *Wolbachia*. However, their results are not representative of the real proportion of *Wolbachia*-infected populations because their sampling scheme was not random and a small number of individuals were sampled per population.

*w*VulC was the most prevalent strain, being present in 9 out of 13 populations. *w*VulM came next with a presence in 6 of the 13 populations and finally came *w*VulP, which was found in only one population. These results are similar to those of Cordaux *et al.* (2004) who similarly observed that *w*VulC was the dominant strain (12 out of 20 populations) followed by *w*VulM (4 out of 20 populations). To date, *w*VulP has only been observed in the Poitiers region and in Portugal. As a consequence, this variant seems to have a more restricted repartition than *w*VulC and *w*VulM. Surprisingly the presence of two strains in the same population was relatively common (5 of the 13 populations), whereas the simultaneous presence of all three strains was only observed in one of the popultions.

Globally, the level of infection within a given population was low. Many hypotheses, such as sexual selection against infected females (Moreau *et al.*, 2001), competition with the *f* element (Grandjean *et al.*, 1993; Juchault *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999) and the control of vertical transmission of *Wolbachia* by the host (Rigaud & Juchault, 1992), have been proposed to explain the low prevalence of *Wolbachia*.

Percentages of males (from 15% to 74%) are concordant with previous studies on natural populations of *A. vulgare* (Juchault *et al.*, 1980; Juchault & Legrand, 1981a; Juchault & Legrand, 1981b; Juchault *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999). Percentages of males do not necessarily reflect the primary sex ratio of populations and their interpretation is difficult. Indeed, several studies have shown that percentages of males in wild-caught animals vary greatly according to the season because of different behavior of sexes during the reproductive season and higher mortality of females after reproduction (Al-Dabbagh & Block, 1981; Sörensen & Burkett, 1977). Moreover, we do not have any data on the frequency of the *f* element in the sampled populations. As a consequence, it is not possible to interpret the link between *Wolbachia* prevalence and the observed percentage of males.

2. Genetic variability within populations

Within populations, high levels of microsatellite loci polymorphism were observed in the present study, which contrasts with the extremely low levels of variation that have been found in *A. vulgare* using other genetic markers. For instance, the average heterozygosity ($He = 0.70$) and the number of alleles per locus ($A = 8.2$) observed here in microsatellites largely exceeds values reported in allozyme studies. In their worldwide population genetic study, Garthwaite *et al.* (1995) reported a maximum heterozygosity of 0.21 and a maximum of 2.1 alleles per loci, average based on eight enzyme loci. No deviation from Hardy-Weinberg equilibria was reported in the present study suggesting large population sizes and random mating within these populations. In addition, populations exhibiting a high *Wolbachia* prevalence showed similar levels of genetic diversity than the other populations.

Levels of mtDNA diversity exhibited a small number of mitotypes per population, from 2 to 4. These results are in agreement with previous studies on *A. vulgare* (Bouchon *et al.*, 1998; Grandjean *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999; Souty-Grosset *et al.*, 1992). However, levels of diversity were lower than those reported by Rigaud *et al.* (1999) from populations sampled on a larger geographical scale. These last authors found eleven mitotypes (eight in this study) and one to seven mitotypes (two to four in this study) per population using RFLP on total mtDNA.

3. Horizontal transfers of *Wolbachia*

Previous studies have demonstrated that the observed pattern of association between mitotype and *Wolbachia* strain is incompatible with strict host-parasite coevolution and suggests that the strains have been acquired independently via horizontal transfer (Cordaux *et al.*, 2004). Such transfers are possible through hemolymph contact between injured individuals (Rigaud & Juchault, 1995) or by the route of parasitism (Cordaux *et al.*, 2001). In the present study, and as expected, highly significant linkage disequilibrium between *Wolbachia* and mtDNA was observed. This confirms that, although possible, horizontal transfers are rare at the studied geographical and evolutionary scales.

4. Impact of *Wolbachia* on genetic diversity in host populations

One of the goals of this study was to analyze the hitchhiking effect of *Wolbachia* and other sex factors in populations of the isopod *A. vulgare*. mtDNA F_{ST} and microsatellite F_{ST} generally reflect female gene flow and both male and female gene flow, respectively. However, mtDNA F_{ST} can also reflect population differential selection pressures. Assuming both neutrality, and an equilibrated sex ratio, and in the absence of sex biased dispersal, both nuclear and mitochondrial DNA structures are linked to N_em parameter by Wright's formula (Wright, 1943): $F_{ST} \sim 1/(1+4N_em)$ for nuclear diploid markers and $F_{ST} \sim 1/(1+N_em)$ for mitochondrial DNA (with N_e = effective population size and m = migration rate). We can estimate N_em from microsatellite loci and use this estimation to calculate the expected level of mitochondrial genetic structure under the assumptions of Wright's model. A difference between the expected and observed mtDNA structure would indicate a sex-biased dispersal or non-neutrality of mtDNA. The expected global F_{ST} on mtDNA was in the order of 0.103, which is more than four times lower than the observed value ($F_{ST} = 0.421$). As hypothesized, we show a genetic structure of mtDNA that does not correspond to the genetic structure observed on microsatellite markers. A male-biased dispersal could explain the higher than expected mtDNA structure but not the significant departures from neutrality observed on mtDNA.

Although the genetic structure observed on microsatellite markers is compatible with a model of isolation by distance, the structure of mtDNA is not. Indeed, mtDNA structure is correlated to neither microsatellite genetic structure, nor to geographic distance, although it is significantly linked to *Wolbachia* prevalence structure. As a consequence, gene flow does not act solely on mtDNA structure and another factor clearly also influences this structure. It appears evident that the presence of *Wolbachia* is involved here.

As the microsatellite data revealed that we were not dealing with bottlenecks, it would seem reasonable to propose that the populations are undergoing selection. Three types of selection are possible; positive selection, purifying selection and frequency-dependant selection. Tajima's *D* test, Fu and Li's *Ds* test and Fu's *Fs* test were applied to each population in order to corroborate the hypothesis of selection and to identify the type of selection involved. Fu's *Fs* tests indicate a significant deficit of observed mitotype numbers given the nucleotide diversity π_n, in all studied populations. This means that mutations are not distributed randomly across sequences and that observed mitotypes are more divergent than expected under neutrality. Such a pattern is typically observed in cases of recent demographic bottlenecks or in cases of frequency dependant selection. Tajima's tests and Fu and Li's tests detect significant departures from neutrality in only two and seven populations, respectively. The non-significant results of these tests do not mean that the samples are neutral. We suggest that the results are more likely the result of a lack of power of the tests as compared to Fu's test. Indeed, the power of the tests depends on the kind of selection that occurs on samples (e.g. see Fu, 1997). Tajima's tests and Fu and Li's tests do not take into account the distribution of mutations across haplotypes. As a consequence, they are less powerful than Fu's *Fs* test to detect hitchhiking, for example. On the other hand, Fu and Li's test is considerably more powerful in detecting positive selection or purifying selection than is Tajima's test and Fu's test (Fu, 1997). Thus, it would appear that selection does occur but that it is neither positive nor purifying selection.

5. Evolution of prevalence of *Wolbachia* in natural populations

It is therefore proposed that frequency-dependant selection is involved here. *Wolbachia* and other sex ratio factors are thus under frequency-dependant selection and induce hitchhiking on mtDNA. In a previous study Juchault *et al.* (1993) suggested a frequency dependant selection model, with succession of different sex factors within populations (cyclic succession of genetic females, *Wolbachia* infected females and *f* harbouring females). This first model, however, did not take into account resistance genes to *Wolbachia* that could be selected in the population. Other theoretical models (Taylor, 1990) show that such resistance genes, namely *r* and *M*, can spread in a population after the spread of their corresponding feminizing factor (*f* and *Wolbachia,* respectively).

As bottleneck events are not detected, the mtDNA structure observed in the populations sampled is not the result of frequent and/or recent population collapses. Thus the

existence of regulation mechanisms preventing such collapses must exist. Two such mechanisms are proposed here; the presence of resistance genes and a fertility cost.

Resistance and masculinizing genes are very analogous by their specificity to restorer genes found in gynodioecy models (Bailey *et al.*, 2003; Budar *et al.*, 2003; Charlesworth, 1981; Gouyon *et al.*, 1991). Indeed, sexual polymorphism of gynodioecious plants consists in the coexistence of hermaphrodite and female (male sterile) plants within the same populations. Different types of male sterility (associated with different female advantages) are generally encoded on the mitochondrial genome. Nuclear genes ('restorer genes') are able to restore the male function in the presence of sterile cytoplasm, but they generally lead to various kinds of costs (Bailey *et al.*, 2003). When nuclear genes are specific to one or a reduced number of male sterility types, this genetic system can lead to frequency-dependant selection (limit cycles or single point equilibrium), depending on the advantages of the different cytoplasms and the costs associated with the restorer genes.

A second hypothesis, involving a fertility cost, can be proposed to explain the wide range in observed *Wolbachia* prevalence (Moreau *et al.*, 2001). As males prefer non-infected females over infected females, sexual selection could favor non-infected females. Moreover, the more males copulate, the less sperm they have available. As *Wolbachia* is expected to bias sex ratio toward an excess of females in infected populations, the combination of sexual selection and male scarcity could result in lower fitness of infected females limit the spread of *Wolbachia*. These modifications are of course counterbalanced by the feminizing effect of *Wolbachia*.

In conclusion, mtDNA is not a reflection of female gene flow in *A. vulgare* as associate cytoplasm polymorphism and structure reflect the frequency-dependant evolution of sex distorters within natural populations. Theoretical simulations that include both *Wolbachia* and *f* are needed to determine the type of equilibrium that such a system can reach (limit cycle or point equilibrium) and the speed of evolution of the system. Costs of both resistance and masculinizing genes should be tested and analyzed as they could play an important role in maintaining cyclic evolution of the system. Other selection pressures, such as sexual selection by males or cost of infection on fertility and survival of infected females, should also be studied and taken into account. Further population genetic studies are also needed at smaller geographic scales to analyse the effects of local population dynamics and gene flows on sex factor evolution.

E. Acknowledgements

The PhD work of Sébastien Verne is supported by a doctoral fellowship from the Région Poitou-Charentes.

We thank Nicolas Puillandre, Sylvie Patri and Daniel Guyonnet for technical assistance in genotyping and sequencing and Robert Comte for assistance in sampling. We are grateful to Richard Cordaux, Thierry Rigaud and Laurent Keller for comments on the manuscript.

F. Supplementary material:

Table IV-6 Geographic distances (above diagonal) and F_{ST} estimated from *Wolbachia* prevalence (below diagonal). Values in bold are significant after sequential Bonferroni adjustment for 78 simultaneous tests at the 5% probability level.

	RBINord	RBISud	RBICentre	Villeneuve	St Séverin	Chizé	Beauvoir	Gript	La Crèche	St Maixent	Coulombiers	Ensoulesse	Poitiers
RBINord		4.76	2.13	6.49	5.89	2.16	5.66	9.19	26.59	35.13	61.11	83.66	77.69
RBISud	0.202		2.95	3.42	2.04	4.68	9.47	13.59	31.18	39.54	64.54	87.18	81.14
RBICentre	-0.033	0.130		5.57	3.77	3.55	7.65	11.32	28.24	36.58	61.88	84.47	78.47
Villeneuve	0.054	**0.433**	0.153		5.20	8.07	9.33	13.74	32.92	41.54	67.39	82.96	84.02
St Séverin	0.200	0.057	0.108	**0.431**		3.64	11.12	15.02	31.59	39.72	63.92	86.61	80.54
Chizé	0.054	**0.433**	0.153	0.000	**0.431**		10.83	13.98	28.58	36.50	60.31	89.98	76.91
Beauvoir	-0.035	0.188	-0.032	0.057	0.194	0.057		4.42	24.80	33.81	61.80	84.09	78.27
Gript	-0.000	0.180	0.015	0.080	**0.242**	0.080	-0.009		21	30.13	59.10	81.12	75.39
La Crèche	-0.036	0.217	-0.025	0.043	0.222	0.043	-0.028	-0.006		9.18	39.92	61.07	55.62
St Maixent	**0.498**	0.140	**0.453**	**0.642**	**0.376**	**0.642**	**0.490**	**0.463**	**0.514**		31.58	52.12	46.82
Coulombiers	0.005	0.153	0.013	0.100	**0.224**	0.100	-0.007	-0.032	-0.003	**0.437**		22.69	16.62
Ensoulesse	-0.036	0.148	-0.041	0.097	0.151	0.097	-0.031	-0.003	-0.027	**0.456**	-0.003		6.32
Poitiers	0.210	-0.005	0.144	**0.432**	0.077	**0.432**	0.208	0.206	0.236	0.198	0.182	0.138	

Table IV-7 Estimates of F_{ST} (above diagonal) and φ_{ST} (below diagonal) between sample pairs from mtDNA marker. F_{ST} are based on mitotype frequencies and φ_{ST} take into account mitotype distances. Values in bold are significant after sequential Bonferroni adjustment for 78 simultaneous tests.

	RBINord	RBISud	RBICentre	Villeneuve	St Séverin	Chizé	Beauvoir	Gript	La Crèche	St Maixent	Coulombiers	Ensoulesse	Poitiers
RBINord		0.170	0.340	0.027	0.504	0.364	-0.083	-0.017	**0.453**	**0.784**	0.264	**0.580**	0.424
RBISud	0.314		0.022	**0.445**	0.152	0.008	0.145	**0.366**	**0.293**	**0.378**	0.086	**0.370**	0.139
RBICentre	0.448	-0.033		**0.549**	**0.404**	0.206	0.236	**0.449**	**0.336**	0.141	0.012	**0.466**	0.153
Villeneuve	-0.029	**0.559**	**0.650**		**0.724**	**0.606**	0.101	-0.001	**0.619**	**0.858**	**0.459**	**0.756**	**0.660**
St Séverin	0.555	0.025	0.145	**0.722**		-0.005	**0.474**	**0.675**	**0.535**	**0.743**	**0.462**	**0.564**	**0.437**
Chizé	0.555	0.001	0.080	**0.717**	-0.054		**0.348**	**0.553**	**0.410**	**0.553**	**0.291**	**0.443**	0.261
Beauvoir	-0.108	0.239	0.327	0.125	**0.455**	**0.452**		0.011	**0.402**	**0.583**	0.172	**0.522**	**0.367**
Gript	-0.108	**0.490**	**0.578**	-0.019	**0.674**	**0.668**	0.032		**0.557**	**0.776**	0.353	**0.696**	**0.577**
La Crèche	-0.075	0.389	**0.475**	0.086	**0.588**	**0.583**	0.007	0.012		**0.586**	**0.303**	**0.515**	**0.357**
St Maixent	**0.743**	0.158	0.045	**0.830**	**0.356**	**0.245**	**0.559**	**0.776**	**0.685**		0.225	**0.756**	0.453
Coulombiers	0.194	0.027	0.047	**0.437**	0.194	0.169	0.164	**0.366**	0.280	0.194		**0.440**	0.170
Ensoulesse	0.657	**0.531**	**0.602**	**0.785**	**0.608**	**0.608**	**0.625**	**0.756**	**0.693**	**0.740**	0.332		**0.417**
Poitiers	0.676	0.111	0.145	**0.811**	0.162	0.113	**0.520**	**0.756**	**0.655**	0.357	0.196	0.656	

Table IV-8 Multilocus estimates of F_{ST} (below diagonal) between sample pairs from 5 microsatellite loci. Values in bold are significant after sequential Bonferroni adjustment for 78 simultaneous tests.

	RBINord	RBISud	RBICentre	Villeneuve	St Séverin	Chizé	Beauvoir	Gript	La Crèche	St Maixent	Coulombiers	Ensoulesse	Poitiers
RBINord													
RBISud	0.021												
RBICentre	0.003	0.002											
Villeneuve	0.004	0.030	0.008										
St Séverin	0.007	0.008	-0.004	0.008									
Chizé	0.004	0.020	0.018	0.018	0.007								
Beauvoir	0.006	0.018	-0.001	0.016	0.017	0.022							
Gript	0.016	0.022	0.002	0.032	0.007	0.021	0.020						
La Crèche	0.003	**0.061**	0.021	0.025	0.032	0.025	0.035	0.029					
St Maixent	0.034	**0.075**	**0.036**	**0.065**	**0.074**	**0.067**	0.018	**0.041**	**0.052**				
Coulombiers	0.028	**0.077**	0.029	**0.043**	**0.042**	**0.048**	0.038	0.026	0.006	**0.041**			
Ensoulesse	0.013	**0.050**	0.018	**0.040**	0.030	0.019	0.017	0.021	0.010	0.021	0.020		
Poitiers	0.025	**0.083**	0.043	**0.063**	0.046	**0.045**	**0.054**	0.036	0.009	**0.051**	0.019	0.008	

Table IV-9 Distribution of mitotype according to the location and status infection of the females.

Population	Infection status	Mitotype							
		AvA	AvB	AvD	AvE	AvF	AvG	AvH	AvI
RBINord	*w*VulM	1							
	NI					4			
RBISud	*w*VulC	1		4					
	*w*VulM	3							
	NI	1			1	3			
RBICentre	*w*VulC			5					
	*w*VulM	3							
	NI			4		3			
Villeneuve	NI				1	14			
St Séverin	*w*VulM	7				1			
	NI	4			2				
Chizé	NI	10		3	2	1			
Beauvoir	*w*VulC			1					
	*w*VulM	2							
	NI			2		11			
Gript	*w*VulC			2					
	NI					14			
La Crèche	*w*VulC			1					
	*w*VulM			1			1		
	NI			1		2	9		
St Maixent	*w*VulC			11		1			
	NI			3					
Coulombiers	*w*VulC			3					
	NI			4		4			3
Poitiers	*w*VulC			3					
	*w*VulM	1							
	*w*VulP		4						
Ensoulesse	*w*VulM	1							
	*w*VulP		1						
	NI							7	

V. Analyse de la structuration génétique du système hôtes/parasites *A. vulgare*/*Wolbachia* au sein d'une métapopulation

A. Introduction

Dans le chapitre précédent, l'analyse du polymorphisme de populations pérennes d'*A. vulgare* a confirmé l'idée que les facteurs sexuels dont fait partie *Wolbachia* sont soumis à des pressions de sélection fréquences dépendantes. Plusieurs hypothèses ont été avancées dans la littérature pour expliquer ces pressions de sélection : préférence sexuelle des mâles (Moreau *et al.*, 2001; Rigaud & Moreau, 2004), compétition d'autres facteurs féminisants (élément f ; Rigaud & Juchault, 1993; Rigaud *et al.*, 1999), sélection de gènes de résistance (notamment à la transmission ; Rigaud & Juchault, 1992). Cependant, des phénomènes d'ordre démographique, tels que de forts flux de gènes ou une dynamique de type métapopulation peuvent influencer les prévalences des facteurs féminisants. Le modèle 'métapopulation' a été défini initialement par Levins (Levins, 1969). Une métapopulation est caractérisée par une subdivision en plusieurs populations situées sur des zones d'habitat de taille et de qualité variables. Le taux de croissance et la probabilité d'extinction de chaque population dépendent de nombreux facteurs tels que la qualité de l'habitat ou la densité de population. Chaque population peut émettre une quantité variable de migrants qui permettront la recolonisation des zones d'habitats où les populations se sont soit éteintes, soit présentent des taux de croissance négatifs. Cette dynamique extinction-recolonisation se traduit par un important turn-over des populations et une homogénéisation de la composition génétique des populations. Selon le mode de dispersion, cela peut se traduire par une augmentation ou une diminution de la structuration génétique des populations (Harrison & Hastings, 1996). Plusieurs études théoriques ont montré un impact important de la structuration des populations sur les prévalences des facteurs génétiques égoïstes féminisants tels que *Wolbachia*. La présence de facteurs féminisants peut induire des extinctions locales de populations. En effet, si les mâles sont en nombre insuffisant pour féconder toutes les femelles présentes, le taux de croissance d'une population présentant un excès de femelles, peut diminuer (Hatcher *et al.*, 1999; Hatcher, 2000).

La Réserve Biologique Intégrale de Chizé (RBI de Chizé) constitue un site de choix pour étudier l'impact d'une dynamique de type métapopulation sur les prévalences de

Wolbachia. Cette réserve s'étend sur 2600ha et englobe environ la moitié de la Forêt de Chizé. A partir de 1952, l'OTAN a transformé ce site en base militaire pour y déposer des munitions. Des entrepôts reposant sur des plates formes en béton ont donc été construits et reliés par un réseau d'environ 85 km de routes goudronnées. A partir de 1964, le site a acquis le statut de Réserve Nationale de Chasse et de Faune Sauvage et les entrepôts ont été démentelés. Il ne reste donc que les plates-formes de béton d'environ 10 m par 20 m (au nombre de 222). Jusqu'en 2004, les plates-formes ont servi par intermittence à l'exploitation du bois par l'ONF (Office National des Forêts). Depuis 2005, ce site est devenu Réserve Biologique Intégrale avec par conséquent, une fermeture au public. En 2003, des prospections menées au sein de la Réserve ont permis de montrer l'existence d'habitats plus ou moins favorables à *A. vulgare* au niveau des plates-formes. La forêt environnante semble défavorable à cet isopode puisqu'aucun individu n'y a jamais été trouvé. Les plates-formes ne présentent pas toutes le même type de végétation, ni la même couverture végétale. Leur qualité, en terme d'habitat pour *A. vulgare*, semble donc très variable (voir Figure A-3 en Annexe IV). Les densités de cloportes relevées en 2003 sont également très variables entre elles (Puillandre, 2004). Les routes bordées par des talus enherbés constituent des corridors favorables à la dispersion entre les plates-formes. La combinaison patchs d'habitats de qualité variable et corridors de dispersion permet d'envisager un fonctionnement de type métapopulation.

Les objectifs principaux de ce travail étaient de vérifier par des méthodes indirectes l'existence d'une métapopulation au sein de la RBI de Chizé et de tenter de comprendre les impacts possibles d'une telle dynamique sur les prévalences de *Wolbachia*. En effet, le comportement de dispersion d'*A. vulgare* peut jouer un rôle important dans la structuration génétique observée et dans la régulation des prévalences de *Wolbachia*. La structuration génétique des mâles a été comparée à celle des femelles afin de confirmer une dispersion des mâles plus importante que celles des femelles.

B. Matériels et méthodes

1. Echantillonnage

Dix sous-populations d'*A. vulgare* ont été échantillonnées manuellement au sein de la RBI de Chizé en mai 2003. Ces échantillons ont été utilisés pour analyser la structuration génétique des sous-populations de l'hôte (loci microsatellites et ADN mitochondrial). Afin de suivre l'évolution des prévalences de *Wolbachia* au sein de ces sous-populations, un échantillonage a également été réalisé en mai 2004 et en juin 2005. Dans ce cadre, six

populations supplémentaires ont été prélevées en 2004 pour augmenter l'échantillonnage. La répartition des sous-populations au sein de la RBI est indiquée sur la Figure V-1 et leurs coordonnées géographiques sont mentionnées dans le Tableau V-1 selon le référentiel Lambert II étendu. Les sous-populations ont été choisies en fonction de leurs caractéristiques écologiques. Dans la mesure du possible, j'ai essayé d'échantillonner des milieux variés, en prenant en compte l'ouverture du milieu (c'est à dire la couverture arborée au dessus des plateformes), le type et la quantité de végétation présente sur les plateformes. La présence de refuges appropriés sous forme de morceaux de bois, de pierres ou de branchages a aussi été répertoriée. L'ouverture du milieu a été estimée de visu, puis les plateformes ont été classées selon une échelle allant de 1 (milieu très fermé) à 5 (milieu totalement ouvert). La proportion de couverture végétale a également été évaluée de manière relative de visu.

Il a également été possible de récolter des juvéniles d'un diamètre inférieur à 2,5 mm roulés en boule, sur les plateformes B, H, J, R, Q en 2004 sur la plateforme O en 2003. Vu le cycle de reproduction de l'espèce (Caubet, 1998; Vandel, 1962) et par comparaison avec des animaux élevés au laboratoire, cela correspond à des animaux nés à la fin de l'été-début de l'automne de l'année précédente. Ces échantillons ont été traités génétiquement séparément des individus plus âgés et sont notés respectivement Bp, Hp, Jp, Rp, Qp et Op (le 'p' additionnel à la lettre de la plateforme indique qu'il s'agit d'un échantillon de juvéniles). Ces juvéniles étaient généralement dispersés sur les même zones que les adultes et ne formaient pas d'agrégation particulière, sauf sur la plateforme O où ils ont été échantillonnés dans deux touffes de graminées séparées par environ 2 m de sol nu (plateforme de béton). Les deux groupes de juvéniles ont été analysés séparément et sont notés Op1 et Op2.

Afin d'étudier la connectivité de ces sous-populations avec les populations extérieures à la RBI, sept populations supplémentaires, appelées ici populations périphériques (PA à PG), ont également été échantillonnées. Ces populations sont majoritairement des populations de milieu prairial. Les populations PC, PD, PE, PF et PG ont été collectées dans des prairies de fauche entourées ou non de haies et/ou de forêts. L'environnement de la population PA est assez similaire à ceux des sous-populations de la RBI de Chizé. Il s'agit d'une aire de stationnement gravillonnée en bord de route, située en lisière forestière. La population PB a été échantillonnée sur un terrain récemment planté de jeunes arbres (< 1 m de haut). Des bandes de bâche plastique noire protègent les pieds de ces jeunes arbres et semblent constituer des abris favorables à *A. vulgare*. Les coordonnées géographiques des populations périphériques sont présentées Tableau V-1 et leur localisation autour de la RBI est indiquée

sur la Figure V-1. Les populations PA, PB, PC, PD et PE ont été échantillonnées le 7 mai 2004 et les populations PF et PG le 27 mai 2005.

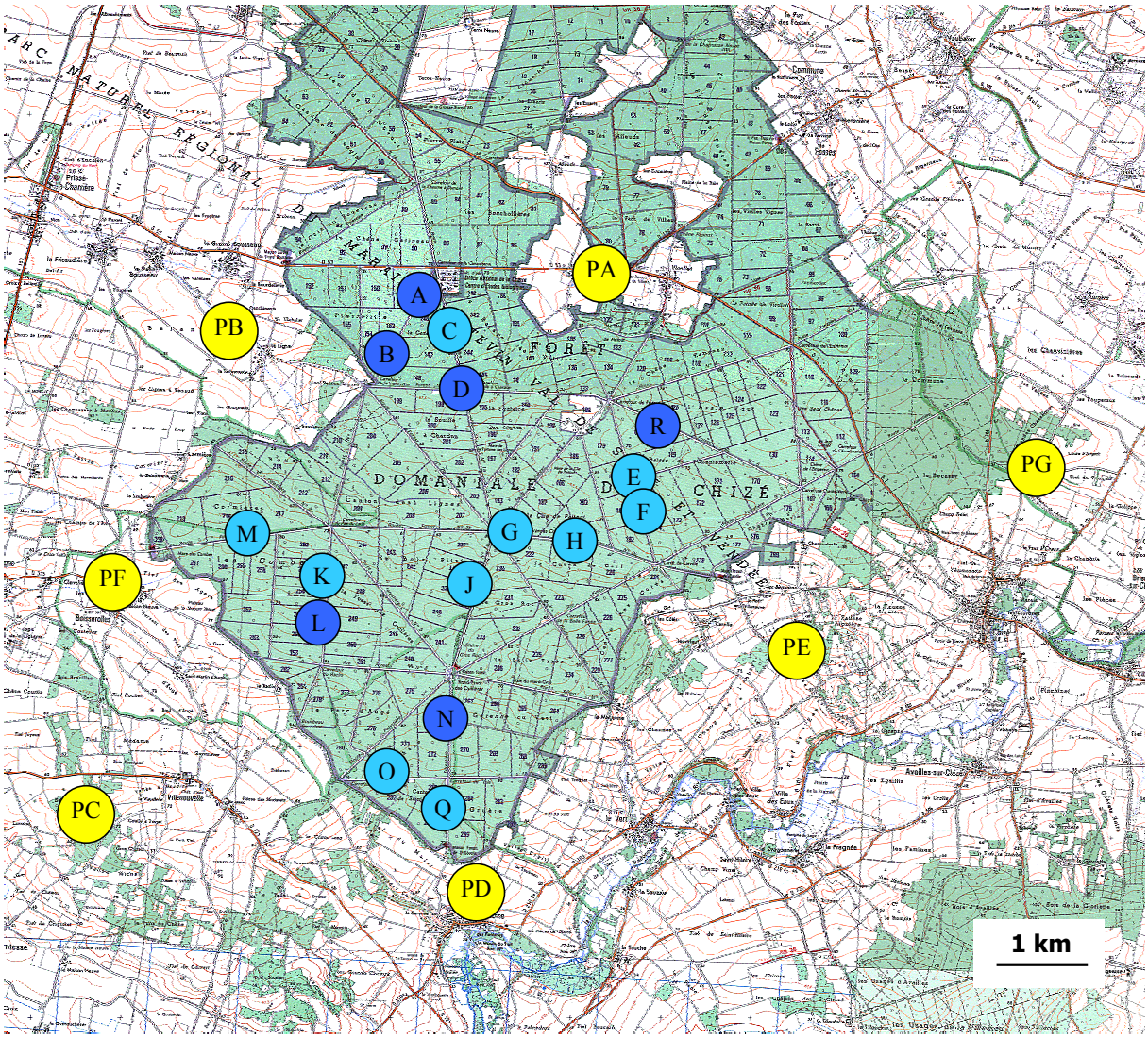


Figure V-1 Localisation des sous-populations d'*A. vulgare* échantillonnées au sein de la réserve biologique intégrale de Chizé et des populations périphériques à celles-ci. Les coordonnées géographiques sont présentées dans le Tableau V-1 et des photographies des différents sites sont présentées en Annexe III. Les sous-populations échantillonées en 2003, 2004 et 2005 sont indiquées en bleu ciel. Les sous-populations supplémentaires échantillonnées en 2005 sont indiquées en bleu foncé.

Lors de la reproduction, les femelles effectuent une mue particulière, nommée mue parturielle, au cours de laquelle elles développent une poche ventrale appelée marsupium. Elles pondent ensuite leurs œufs dans cette poche et les y incubent pendant environ trois semaines. On dit alors qu'elles sont gravides. 80 femelles et un intersexué femelle collectés gravides pendant l'échantillonnage de 2004 ont été placés en élevage afin d'analyser la sexe-ratio de leur descendance et fournir du matériel pour d'autres manipulations (tests de paternité multiple, thèse de Marion Lachat, expériences éthologiques). Les animaux ont été placés individuellement dans des boîtes cylindriques en plastique (diamètre : 8 cm ; hauteur : 5 cm),

Tableau V-1 Caractéristiques et coordonnées géographiques des sites échantillonnés au sein de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et des sept populations périphériques.

(Sous-) Population	Coordonnées géographiques (référentiel Lambert II étendu)		État général Remarques sur site	Couverture (% approximatif)						Ouverture du milieu
	X	Y		Nue (gravier)	Lychens	Mousse	Litière et débris	Herbacés	Abris : Troncs, Pierres, Bâches	
A	386,38	2131,02	Stock de bois retiré en 2004	0	20	10	40	30	0	2
B	386,11	2130,52	Stock de bois retiré en 2004	10	0	0	75	10	5	1
C	386,73	2130,37	Bâche	0	0	0	0	10	90	3
D	386,82	2129,99	Bâche	0	0	0	0	10	90	1
E	388,31	2128,87		10	70	0	15	5	0	2
F	388,36	2128,69	Tas de branchages sur le côté	10	0	40	20	10	20	1
G	387,40	2128,36		10	80	0	0	10	0	3
H	387,95	2128,30	Bâche retirée	80	0	0	10	5	5	3
J	387,05	2127,94	Stock de bois	50	0	0	30	10	10	5
K	385,28	2127,76	Buches présentes en 2003-2004, retirees en 2005	0	0	0	50	20	30	3
L	385,26	2127,35		90	0	0	5	5	0	2
M	384,01	2128,28	Milieu sec	50	0	0	30	5	15	5
N	386,66	2126,21	Milieu sec	80	0	0	15	5	0	5
O	385,98	2125,67		60	0	0	20	20	0	5
Q	386,67	2125,33		50	0	0	20	30	0	2
R	389,07	2129,54		20	20	20	20	20	0	2
PA	388,71	2131,34	Parking routier en gravier en lisière forestière	-	-	-	-	-	-	-
PB	384,12	2130,58	Terrain planté de jeunes arbres	-	-	-	-	-	-	-
PC	382,75	2125,26	Prairie entourée de haies et de bois	-	-	-	-	-	-	-
PD	387,92	2124,60	Prairie, très proche de la RBI	-	-	-	-	-	-	-
PE	390,66	2126,94	Prairie entourée de haies et de bois	-	-	-	-	-	-	-
PF	382,90	2127,78	Fossé caillouteux en bordure d'une pâture	-	-	-	-	-	-	-
PG	393,08	2129,13	Prairie entourée de haies et de bois	-	-	-	-	-	-	-

remplies de terreau horticole humidifié. Ils ont été nourris à satiété de rondelles de carotte et de feuilles de tilleul séchées. La photopériode était longue (16 heures de lumière par jour) et la température était fixée à 20°C. Dès leur libération, les pulli ont été isolées dans des boîtes plus spacieuses (26,5 x 13,5 x 6,5 cm). Environ 6 mois après leur naissance, les mâles et les femelles ont été isolés.

2. Méthodes moléculaires

a) Extraction d'ADN

L'animal est disséqué sous loupe binoculaire et l'ADN est extrait à partir des gonades selon une méthode adaptée du protocole de Kocher *et al.* (1989). Le protocole détaillé est présenté en Annexe I. Les concentrations d'ADN ont ensuite été homogénéisées à 30 ng/ µl.

b) Détection et séquençage des lignées *Wolbachia pipientis*

La présence de *Wolbachia* a été testée sur chaque individu par une amplification PCR spécifique du gène bactérien *wsp* (≈ 580 bp) à l'aide des amorces *wsp* 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') et *wsp* 691R (5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3' ; Braig *et al.*, 1998; Michel-Salzat *et al.*, 2001). L'amplification est réalisée dans un volume de 25 µl, contenant 2 µl d'ADN matriciel (soit environ 60 ng), 1 µM de chaque amorce (sens et antisens), 2,5 µl de Tampon Taq polymérase 10X (Promega: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton X-100 et 15 mM $MgCl_2$), 1,25 µl de dNTP (1,5 mM, 0,125 µl de Taq polymérase (5 U/µl ; Promega). Le cycle PCR utilisé est le suivant : 95°C pendant 5 min., 35 cycles [95°C pendant 1 min., 55°C pendant 1 min., 72°C pendant 1 min.] suivi d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

L'identification des souches de *Wolbachia* a été réalisée en séquençant le gène *wsp* selon le protocole de Cordaux *et al.* (2004) avec les deux amorces *wsp* 81F et *wsp* 691R. Seuls les individus infectés récoltés en 2003 dans la RBI de Chizé et tous les individus infectés collectés dans les populations périphériques ont été séquencés. Etant donné que seules deux souches de *Wolbachia* (*w*VulC et *w*VulM) ont été observées dans ces populations, une technique plus rapide et moins couteuse a été mise en œuvre pour identifier la souche de *Wolbachia* des autres individus infectés collectés dans la RBI de Chizé en 2004 et 2005. Un test RFLP avec l'enzyme de digestion MunI (C/AATTG ; Biolabs, New England) permet de distinguer rapidement *w*VulC et *w*VulM. En effet, MunI coupe le produit PCR *WSP* en deux fragments de 396 et 334 pb pour la lignée *w*VulM mais pas le produit PCR de la lignée *w*VulC. Le milieu réactionnel a été défini comme suit : 4 µl de produit PCR, 1 µl de tampon

10X, 0,5 µl d'enzyme MunI (10 U/µl), QSP H_2O 10 µl. Les échantillons sont alors incubés 2 h à 37°C.

c) Génotypage des marqueurs microsatellites

Cinq loci microsatellites ont été utilisés au cours de ce travail (*Av1*, *Av2*, *Av5*, *Av6*, *Av8* ; Tableau V-2). Les loci sont amplifiés individuellement par PCR dans un volume réactionnel de 12,5 µl contenant 1 µl d'ADN matriciel (environ 30 ng), 0,4 µM de chaque amorce (sens et antisens), 1,25 µl de Tampon Taq polymérase 10X (Promega: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton X-100 et 15 mM $MgCl_2$), 0,5 µl de dNTP (1,5 mM) et 0,05 µl de Taq polymérase (5 U/µl, Promega). Le cycle PCR utilisé est le suivant : 95°C pendant 5 min., 35 à 38 cycles [95°C pendant 30 sec., 30 sec. à la température d'hybridation spécifique du locus amplifié, 72°C pendant 45 sec.] suivi d'une élongation finale de 10min à 72°C.

Tableau V-2 Séquence des amorces et leur marquage (Fluorophore 6-FAM ou HEX), températures d'hybridation ™ et nombre de cycles (*N*) de PCR des loci microsatellites.

Locus	Amorces	Marquage 5'	Motif	T_m	N	Taille (pb)
Av1	F*: TGGAGTCAACTCACATTCTG R: TGTCTGTAAAACTTGTGCTACG	6 FAM	$(CA)_{10}$	56	35	108-114
Av2	F*: TGAAGTTCGGGTGAATTGTG R: ATACCATGACGTGTCGCAAG	6 FAM	$(CA)_9(CG)_3(CA)_2$	56	35	159-165
Av5	F*: CGTGCGAAGTTCAGATTCTTT R: GCGCGCTCGAGGATTTAC	6 FAM	$(CA)_{13}$	56	38	286-396
Av6	F*: GGAATGAGGTCGTCGACTATG R: GTCTTTCAAACGGGCACAAT	6 FAM	$(GT)_8AT(GT)_2$	56	35	166-178
Av8	F*: CAACATCCTAATATTCAGTTCTCA R: AGTTTACAGAATACGGCTGAGG	HEX	$(CA)_{32}$	48	38	152-192

Les produits PCR sont ensuite transférés dans une solution de formamide (18 µl de formamide désionisée, 0,5 µl de marqueur de taille TAMRA 500 ou ROX 500, 2 µl de produit PCR) et dénaturé à 95°C pendant 3 min. Les produits de PCR ont été multiplexés dans chaque échantillon (deux à quatre loci différents par échantillon). Les échantillons ont ensuite été analysés à l'aide de deux séquenceurs à capillaires (séquenceurs automatiques Applied Bio System, modèles ABI PRISM 310 et ABI 3130 Avant). La plus grande partie des échantillons a été analysée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Génétique Cellulaire et Moléculaire (UPRES EA 2622) dirigé par le Pr KITZIS (UMR CNRS 6187, Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaire).

d) Génotypage de l'ADN mitochondrial

Séquençage : Une région d'environ 1550 pb a été amplifiée à l'aide des amorces 5f4 (5'-GCACCACATCACGCCATCATT) et 5r3 (5'-GCTTTACCCTCACTTCGGCTT) (Marcadé *et al.*, non publié). Le programme PCR utilisé est le suivant : 95°C pendant 3 min., suivi de 40 cycles [95°C pendant 45 sec., 55°C pendant 45 sec. et 72°C pendant 100 sec.] et une élongation finale de 15 min. à 72°C. Les produits PCR sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%, tampon TAE 1X) puis purifiés avec le kit Jetpure (Genomed) en suivant les indications du fabriquant. Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide d'un kit BigBye Terminator 3.1 (Applied Biosystem) et analysées sur un Séquenceur Applied Bio System 3130 Avant. Toutes les séquences ont été alignées visuellement avec le logiciel Bioedit (Hall, 1999). Une portion de 608-616 pb de l'ADN mitochondrial comprenant la région 3' de la sous-unité II de la cytochrome oxydase (*COX2* ; 354 pb) et la région 3'adjacente de ce gène (256-261 pb), a été séquencée en utilisant l'amorce interne CO2dir (5'-GAGAGYCCYATCCTTGAAGAAG). La séquence de chaque mitotype a été vérifiée dans le sens réverse avec l'amorce interne 5r3.

RFLP-PCR : Le génotypage par séquençage d'une portion du gène *COX2* de l'ADN mitochondrial de 204 individus de la RBI de Chizé et des populations périphériques a montré l'existence de 4 mitotypes distincts au sein de la RBI de Chizé et dans les populations périphériques. Le nombre d'individus à génotyper dans cette étude étant important, une alternative basée sur des digestions enzymatiques a été mise en place. L'analyse des sites de restrictions a montré qu'il était possible de distinguer facilement les quatre mitotypes observés à l'aide de 2 enzymes de restriction (TspR I et Ssp I ; Figure V-2). La région du gène *COX2* étudiée est amplifiée par PCR dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2 µl d'ADN matriciel (soit environ 60 ng d'ADN), 0,5 µM d'amorce sens *5f4* et d'amorce antisens *CO2dir*, 2,5 µl de Tampon Taq polymérase 10X (Promega: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 1% Triton X-100 and 15 mM $MgCl_2$), 1,25 µl de dNTP (1,5 mM) et 0,125 µl de Taq polymérase (Promega ; 5 U/µl). Les produits PCR sont ensuite digérés à l'aide de deux enzymes de restriction Ssp I et TspR I (Biolabs). Les sites de restriction sont respectivement AAT˘ATT et NNCASTGNN˘. Les milieux réactionnels ont un volume de 10 µl comprenant 4 µl de produits PCR, 0,5 µl d'enzyme (10 U/µl) et 1 µl du tampon 10X qui lui est associé, QSP 10 µl d'eau. Le milieu réactionnel de l'enzyme TspR I contient en plus 0,1 µl de BSA (100 µg/ml). Les digestions sont faites à 37°C pour Ssp I et 65°C pour TspR I pendant 2

heures minimum. Les profils de digestion observés sont présentés sur la Figure V-2 et permettent d'assigner le bon génotype à chaque individu sans ambiguïté.

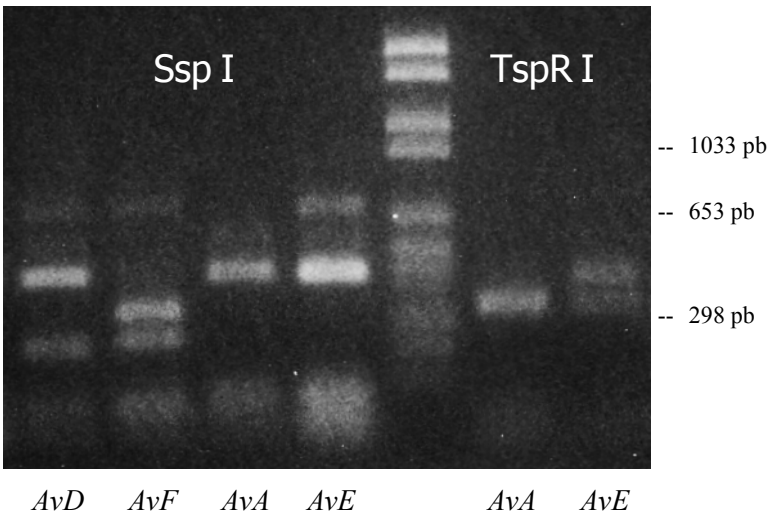


Figure V-2 Profils de digestions enzymatiques des 4 mitotypes observés après digestion de l'enzyme Ssp I (à gauche) et TspR I (à droite).

C. Résultats

1. Prévalence de *Wolbachia* et proportion des sexes

Au total 1216 cloportes ont été collectés au sein de la RBI de Chizé (769 adultes et 178 juvéniles) et dans les sept populations périphériques étudiées (269, collectés sur deux années). Les effectifs collectés et les dates précises d'échantillonnage sont présentés dans la Tableau V-5. Il faut noter qu'il n'a pas été possible de collecter un seul animal dans les sous-populations C et E en 2005 malgré une prospection intensive de ces sites. Les effectifs vont de 9 à 44 individus par sites, tous sites confondus. Dans la mesure où l'échantillonnage avait pour but de collecter un nombre suffisant d'individus et non d'estimer la densité de population de chaque site, ils ne reflètent pas forcément la taille de chaque (sous-)population.

Tableau V-4 Tests G d'équilibre de la proportion des sexes sur les différents échantillons collectés dans la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et les populations périphériques. * *P* < 0,0001**

	Réserve Biologique Intégrale de Chizé				Populations périphériques
	Echantillons 2003	Echantillons 2004	Echantillons 2005	Echantillons juvéniles	
$G_{\text{Homogénéité}}$	***	0,001	0,012	0,017	0,162
G_{Pool}	0,053	***	***	***	0,111
$G_{\text{Test global}}$	***	***	***	***	0,110

294 mâles, 470 femelles et 5 intersexués femelles (ovaires fonctionnels, présence d'appendices copulateurs mâles réduits) de taille supérieure à 2,5 mm de diamètre ont été collectés au sein de la RBI de Chizé au cours des trois années d'échantillonnage (total : 769

individus). Globalement, les tests G_{Pool} de proportions des sexes indiquent un nombre total de femelles significativement plus grand que celui des mâles pour les échantillons poolés collectés en 2004 ($P < 10^{-5}$) et en 2005 ($P < 10^{-5}$) au sein de la RBI de Chizé de même que parmi les échantillons de juvéniles ($P < 10^{-5}$; Tableau V-3). La proportion de femelles est presque significativement plus importante que celle des mâles pour les échantillons poolés de 2003 ($P = 0{,}053$). Les tests G d'hétérogénéité des échantillons appliqués séparément sur chaque groupe d'échantillons de la RBI (2003, 2004, 2005 et juvéniles) indiquent que les proportions des sexes sont significativement différentes entre les sous-populations de la RBI. Comme déjà dit au chapitre IV, les pourcentages de mâles dans les échantillons sont difficiles à interpréter et ne sont pas représentatifs des sexe-ratios réelles des populations, en particulier si les mâles et les femelles présentent des comportements différents, ce qui est le cas chez *A. vulgare* (Caubet Y., pers. comm.).

Analysé au cas par cas, le pourcentage de mâles varie de 0 à 78% selon la sous-population (Tableau V-5). Seuls les échantillons J collecté en 2003, B et Hp collectés en 2004 et K et O collectés en 2005 présentent une proportion significativement plus importante de femelles que de mâles, après corrections de Bonferroni ($k = 48$). On peut noter qu'aucun mâle n'a été observé dans les échantillons J de 2003 et L de 2005. Les intersexués femelles ont été trouvés dans les échantillons B (1 individu), G (1 individu), J (2 individus) et O (1 individu) collectés en 2004.

121 mâles, 147 femelles et un intersexué femelle ont été collectés dans les sept populations périphériques échantillonnées (total : 269). Les échantillons réalisés dans ces populations ne présentent pas un % de mâles significativement différent de 50% lorsqu'on les poole. Ils ne présentent pas d'hétérogénéité significative du pourcentage de mâles entre populations et aucun d'entre eux ne présente une proportion de mâles biaisée (29 à 57% de mâles). L'intersexué femelle a été trouvé dans la population PE.

Tableau V-5 Echantillonnage réalisé au cours de trois années dans la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et dans les sept populations périphériques. Le nombre de mâles et femelles collectés ainsi que les probabilités associées aux tests G de biais de proportion des sexes sont indiqués pour chaque échantillonnage. Les valeurs en gras indiquent les tests significatifs après corrections de Bonferroni.

		N			Test G de biais de proportion des sexes		
		6 mai 2003	4 mai 2004	6 juin 2005			
Population		♂/♀	♂/♀ (I)	♂/♀	6 mai 2003	4 mai 2004	6 juin 2005
A	Adultes		12/19			0,207	
B	Adultes		**5/24 (1)**			***	
C	Adultes	14/5	13/11	0/0	0,035	0,683	-
D	Adultes		5/19			0,003	
E	Adultes	7/2	14/7	0/0	0,086	0,123	-
F	Adultes	10/5	9/11	4/6	0,192	0,654	0,526
G	Adultes	4/15	7/20 (1)	7/12	0,009	0,011	0,249
H	Adultes	8/9	15/22	12/13	0,808	0,248	0,841
J	Adultes	**0/12**	8/17 (2)	7/14	***	0,069	0,123
K	Adultes	7/8	19/11	**0/12**	1,000	0,142	***
L	Adultes		15/17			0,724	
M	Adultes	7/8	8/17	9/13	0,796	0,069	0,392
N	Adultes		15/17			0,724	
O	Adultes	5/14	19/19	**6/31**	0,035	1,000	***
Q	Adultes	3/11	11/20 (1)	4/10	0,027	0,103	0,103
R	Adultes		5/19 *			0,003	
Total adultes		65/89	180/270 (5)	49/111			
Bp	Juvéniles		22/19			0,639	
Hp	Juvéniles		**3/19**			***	
Jp	Juvéniles		11/13			0,683	
Op1	Juvéniles	5/14			0,035		
Op2	Juvéniles	7/12			0,249		
Qp	Juvéniles		8/11			0,490	
Rp	Juvéniles		8/26			0,002	
Total juvéniles		12/26	52/88				

		N		Test G de biais de proportion des sexes	
		7 mai 2004	27 mai 2005		
Population		♂/♀ (I)	♂/♀	7 mai 2004	27 mai 2005
PA	Adultes	13/12		0,841	
PB	Adultes	24/18		0,354	
PC	Adultes	21/23		0,763	
PD	Adultes	14/20		0,302	
PE	Adultes	14/20 (1)		0,302	
PF	Adultes		14/34		0,003
PG	Adultes		21/20		0,876
Total adultes		86/93 (1)	35/54		

* échantillonnés le 25 mai 2004

Parmi les échantillons collectés dans la RBI de Chizé en 2004, la prévalence globale de *Wolbachia* est de 62,9% chez les femelles, avec 44,4% d'infection par *w*VulC et 18,5% d'infection par *w*VulM. Lorsque l'on compare les échantillonnages réalisés en 2003, 2004 et 2005, on n'observe pas de différences significatives des prévalences de *Wolbachia* (test χ^2 sur les femelles des sous-populations F, G, H, J, L, M, O et Q poolées, ddl = 4, P = 0,14). Les prévalences de *Wolbachia* sont fortement variables au sein de la RBI, variant de 0 à 100% d'infection selon l'échantillon. Les prévalences de *Wolbachia* et les proportions des sexes

observées sont présentées pour les échantillons collectés dans les sous-populations de la RBI collectées en 2004 et dans les sept populations périphériques sur la Figure V-3. Deux cartes supplémentaires (Figures A-1 et A-2 en annexe IV) présentent les prévalences de *Wolbachia* dans les échantillons collectés en 2003 et en 2004 dans la RBI. L'ensemble des résultats par population est également présenté dans le Tableau A-1 en Annexe IV. Etant donné le fort déséquilibre de liaison avec le marqueur mitochondrial (voir page 110) aucune analyse de structuration n'a été effectuée sur *Wolbachia* car elle n'apporterait que peu d'informations supplémentaires. Deux intersexués femelles récoltés dans la RBI de Chizé étaient infectés par *w*VulC. Les trois autres intersexués collectés dans la RBI et l'intersexué collecté dans la population PE n'étaient pas infectés.

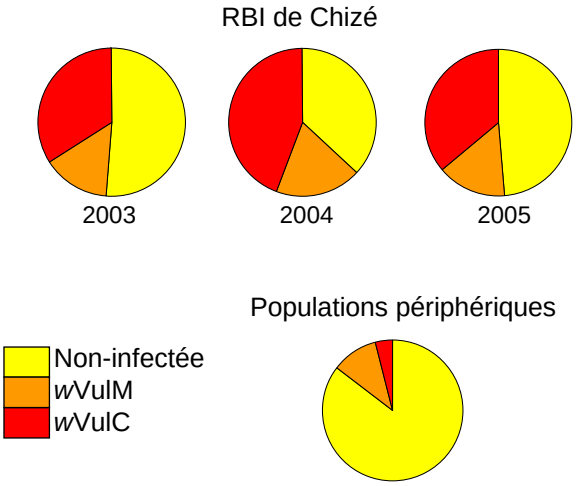


Figure V-3 Prévalence de *Wolbachia* parmi les femelles dans les échantillons collectés en 2003, 2004 et 2005 dans la RBI de Chizé et dans les sept populations périphériques étudiées.

On peut noter que les prévalences varient fortement d'une population à l'autre : certaines populations présentent des taux d'infection très élevés (par exemple J en 2003 ou B en 2004), d'autres des taux d'infection intermédiaires (par exemple G, M, H, O ou Q), et d'autres paraissent non infectées (par exemple K, PA, PC et PF). Il n'y a pas de lien apparent entre la prévalence de *Wolbachia* et le pourcentage de mâles. La plupart des (sous-)populations infectées le sont par les deux souches *w*VulM et *w*VulC. De fortes différences peuvent être observées même entre des populations distantes de quelques centaines de mètres, comme par exemple entre les sous-populations C et D dans l'échantillonnage 2005 (Figure V-4). La structuration observée est également similaire d'une année sur l'autre. Afin de plus de clarté, les autres résultats obtenus sur les prévalences de *Wolbachia* sont présentés de manière plus détaillée page 111.

Dans les populations périphériques, les prévalences de *Wolbachia* sont beaucoup plus faibles que dans la RBI de Chizé (Figures V-3 et V-4), avec une prévalence globale de 14,7% (10,7% de *w*VulM et 4% de *w*VulC). Cependant, seule la population PD présente une prévalence élevée (70% des femelles infectées par *w*VulM). Les autres populations paraissent relativement peu ou pas infectées (maximum 20% des femelles dans la population PB).

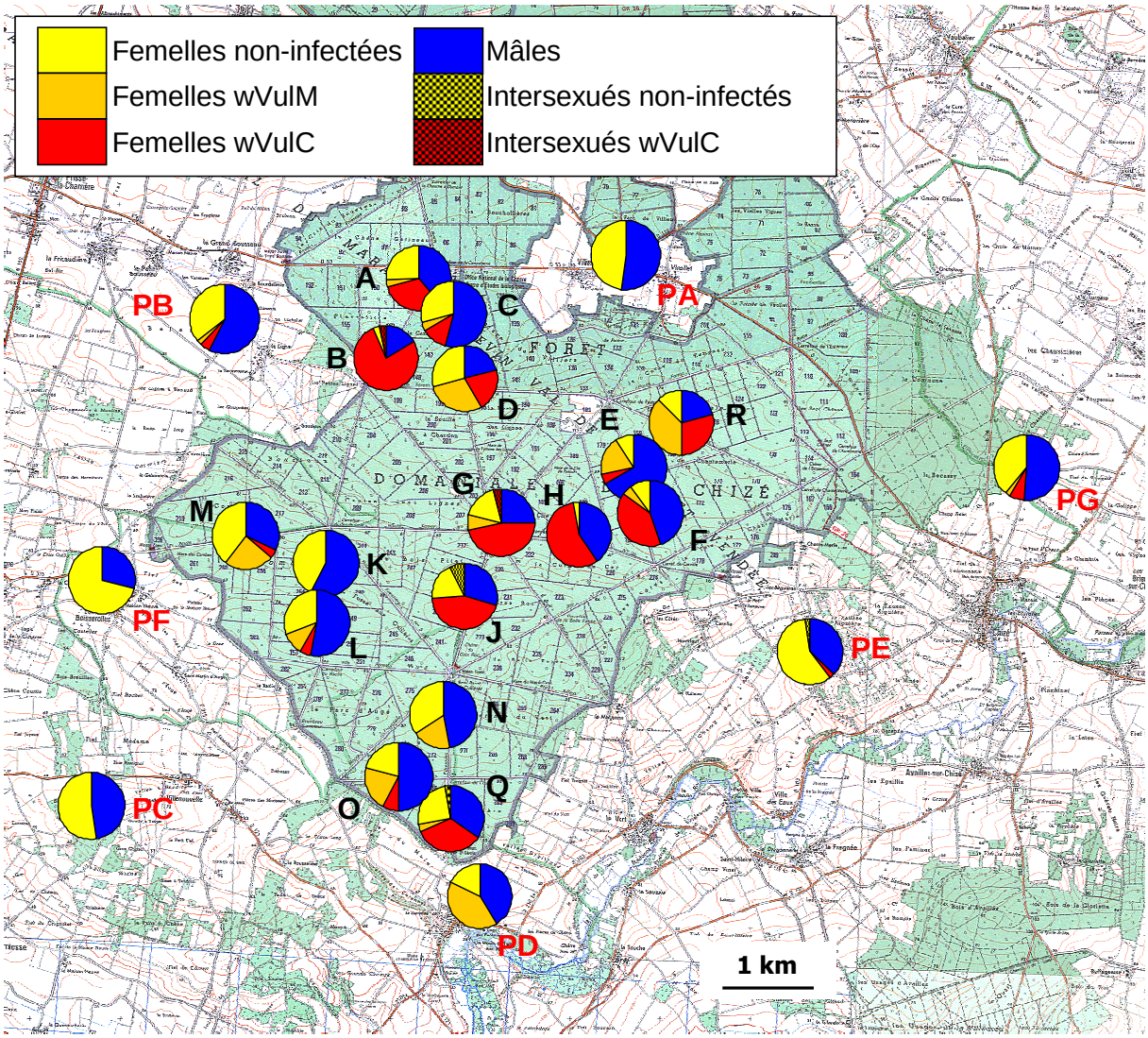


Figure V-4 Prévalence de *Wolbachia* et proportions des sexes au sein de seize sous-populations d'*A. vulgare* échantillonnées en 2004 au sein de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et de sept populations périphériques échantillonnées en 2004 et 2005.

2. Quelques traits d'histoire de vie des femelles en fonction de leur statut d'infection

Parmi les 80 femelles et l'intersexué femelle collectés gravides et placés en élevage, 68 femelles et l'intersexué ont donné naissance à au moins une portée de pulli (premier stade de développement des cloportes après l'éclosion des œufs). Parmi ces femelles, 17 étaient infectées par *w*VulC, 14 par *w*VulM et 37 n'étaient pas infectées. L'intersexué femelle était

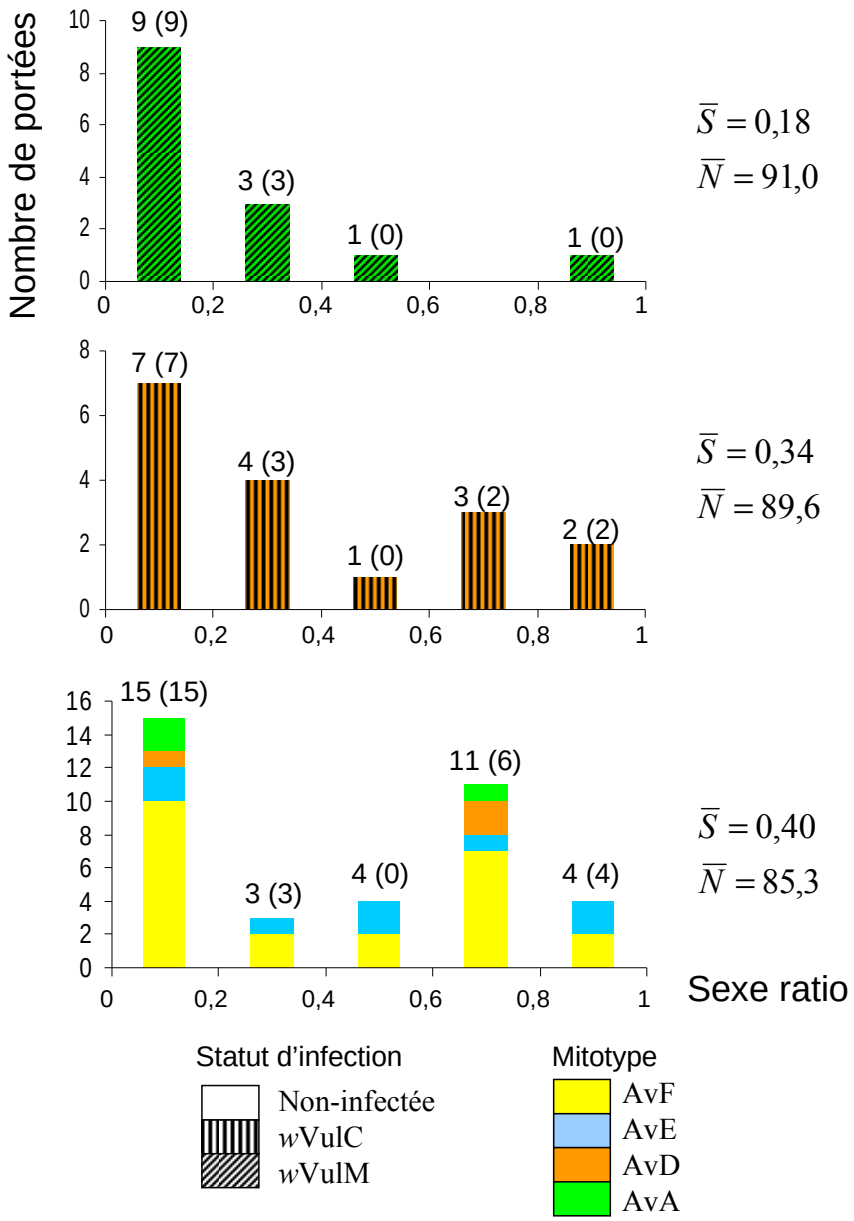


Figure V-5 Répartition des sexe-ratios dans les descendances de 68 femelles collectées gravides dans la RBI de Chizé et qui ont donné une descendance. Du haut vers le bas, les graphiques présentent les sexe-ratios dans les descendances des femelles infectées par *w*VulM, par *w*VulC et des femelles non-infectées. Les mitotypes ont été identifiés par PCR-RFLP sur le gène *COX2*. Les nombres au dessus des histogrammes indiquent le nombre de portées total suivi du nombre entre parenthèses de portées dont la sexe-ratio est significativement différente de 0,5.

infecté par *w*VulC. Les femelles infectées par *w*VulM et par *w*VulC présentaient toutes le même type mitochondrial associé à leur statut d'infection (respectivement AvA et AvD ; Figure V-5). Les femelles non-infectées peuvent être associées aux quatre mitotypes trouvés dans la RBI de Chizé. Cependant, elles sont majoritairement associées aux mitotypes AvF (62,2 %) et AvE (21,6%). Les répartitions des sexe-ratios observées pour chaque type de femelles sont présentées sur la Figure V-5.

Les sexe-ratios des descendances infectées par *w*VulM présentent une distribution unimodale biaisée en faveur des femelles (moyenne = 0,18). 12 portées sur les 14 présentent une sexe-ratio significativement inférieure à 0,5. Aucune portée ne présente de sexe-ratio biaisée en faveur des mâles. Les sexe-ratios des femelles infectées par *w*VulC sont plus variables et en moyenne plus élevées (moyenne = 0,34) que celles des femelles infectées par *w*VulM. Dix portées sont significativement biaisées en faveur des femelles mais 4 sont significativement biaisées en faveur des mâles. Enfin, les portées des femelles non infectées présentent des sexe-ratios encore plus variables, avec une distribution clairement bimodale (un mode de portées dont la sexe-ratio est inférieure à 0,2 et un mode de portées avec une sexe-ratio légèrement supérieure à 0,5). La moyenne des sexe-ratios des portées des femelles non infectées est de 0,40. Une telle distribution est incompatible avec la distribution unimodale attendue avec des femelles génétiques *ZW*. La présence de l'élément *f* dans la métapopulation est donc probable. Les tailles de portée présentent de fortes variations d'une femelle à l'autre (de 5 à 213 pulli par portée) et sont difficilement comparables étant donné que les femelles ont été prélevées sur des sites de qualités différentes. On peut cependant noter que les moyennes des tailles de portées sont comparables pour les trois types de mères.

3. Polymorphisme des marqueurs nucléaires de l'hôte

a) Diversité génétique

Les loci microsatellites montrent des niveaux de polymorphisme remarquablement homogènes au sein des échantillons collectés dans la RBI de Chizé et dans les populations périphériques (Tableau V-6). La richesse allélique est en moyenne de 6,38 parmi les échantillons d'adultes (min. 5,61 ; max. 6,94) et de 6,14 dans les échantillons de juvéniles (min. 5,34 ; max. 6,54) collectés dans la RBI de Chizé, et de 6,33 dans les populations périphériques (min. 5,93 ; max. 6,66). L'hétérozygotie attendue est élevée et en moyenne respectivement de 0,765 (min. 0,723 ; max. 0,798) et de 0,769 (min. 0,735 ; max. 0,804) dans les échantillons d'adultes et de juvéniles collectés dans la RBI de Chizé, et de 0,773 dans les populations périphériques (min. 0,759 ; max. 0,785).

Tableau V-6 Analyse du polymorphisme des loci microsatellites au sein de la RBI de Chizé et des populations périphériques. Les valeurs F_{IS} ont été testées par 10000 permutations. Les valeurs significatives au seuil de 5% sont indiquées en gras. La seule valeur significative après correction de Bonferroni est soulignée.

Population	*N*	Richesse allélique	*He*	*Ho*	*Fis*
Adultes de la RBI de Chizé					
C	19	6,33	0,761	0,705	0,075
E	9	6,60	0,723	0,733	-0,015
F	15	5,61	0,751	0,813	-0,086
G	19	6,15	0,773	0,758	0,020
H	16	6,62	0,785	0,771	0,018
J	12	6,79	0,772	0,817	-0,061
K	14	5,84	0,769	0,729	0,055
M	15	6,94	0,778	0,800	-0,029
O	18	6,62	0,798	0,733	0,083
Q	14	6,28	0,744	0,657	0,121
Moyenne	15,1	6,38	0,765	0,752	0,023
Ecart-type		0,42	0,023	0,050	
Juvéniles de la RBI de Chizé					
Bp	20	5,34	0,735	0,710	0,035
Hp	21	6,40	0,774	0,770	0,005
Jp	23	6,50	0,762	0,752	0,013
Op1	15	6,11	0,761	0,675	0,116
Op2	19	6,54	0,804	0,683	0,155
Qp	18	5,94	0,779	0,804	-0,033
Moyenne	19,3	6,14	0,769	0,732	0,044
Ecart-type		0,46	0,023	0,051	
Populations périphériques (adultes)					
PA	19	6,14	0,773	0,758	0,020
PB	23	6,54	0,774	0,696	0,103
PC	23	6,56	0,776	0,757	0,026
PD	22	6,45	0,783	0,736	0,061
PE	22	6,66	0,785	0,746	0,051
PF	23	6,04	0,759	0,739	0,026
PG	22	5,93	0,763	0,709	0,073
Moyenne	22	6,33	0,773	0,734	0,052
Ecart-type		0,29	0,009	0,024	

Les tests de Friedman (Statistica Kernel v. 5.5, ©Statsoft France 1984-2000) n'ont pas permis de détecter de différences significatives entre la diversité génétique des échantillons collectés dans la RBI de Chizé et dans les populations périphériques, qu'ils soient basés sur le nombre d'allèles après raréfaction (dl = 16 ; X^2 = 4,542 ; P = 0,47), sur l'hétérozygotie attendue (dl = 16 ; X^2 = 10,776 ; P = 0,82) ou l'hétérozygotie observée (dl = 16 ; X^2 = 11,58, P = 0,77). Les tests donnent des résultats similaires pour les échantillons de juvéniles sur le nombre d'allèles après raréfaction (dl = 5 ; X^2 = 4,886 ; P = 0,43), sur l'hétérozygotie attendue

(dl = 5 ; X^2 = 10,436 ; P = 0,84) ou l'hétérozygotie observée (dl = 5 ; X^2 = 7,989 ; P = 0,16). Les tests de Friedman n'ont pas permis de détecter de différences significatives entre la diversité génétique des échantillons de juvéniles et de grands individus, qu'ils soient basés sur le nombre d'allèles après raréfaction (dl = 10 ; X^2 = 9,236, P = 0,51), sur l'hétérozygotie attendue (dl = 10 ; X^2 = 9,964, P < 0,44) ou l'hétérozygotie observée (dl = 10 ; X^2 = 13,809, P = 0,18).

Au sein des échantillons d'adultes collectés dans la RBI de Chizé, le F_{IS} global n'est pas significativement différent de 0 (F_{IS} = 0,023 ; P = 0,10). Cette valeur est un peu plus élevée et devient significativement supérieure à zéro parmi les échantillons de juvéniles (F_{IS} = 0,044 ; P = 0,024). Au sein des populations périphériques, le F_{IS} global est significativement supérieur à zéro (F_{IS} = 0,052 ; P = 0,003). Les valeurs F_{IS} calculées sur chaque échantillon s'échelonnent de -0,086 à 0,155. Seul l'échantillon Op2 présente une valeur F_{IS} significative (F_{IS} = 0,155 ; P = 0,002) après correction de Bonferroni. Globalement, on peut cependant noter que, bien que non significatives, les valeurs F_{IS} ont plutôt tendance à être positives (5 valeurs négatives contre 18 valeurs positives).

b) Déséquilibre de liaison

Les tests de déséquilibre de liaison génique réalisés entre les cinq marqueurs microsatellites (Tableau A-2 en Annexe IV) n'ont pas permis de déceler de déséquilibre d'association significatif après correction de Bonferroni, que ce soit en poolant l'ensemble des populations (k = 10 tests) ou en analysant chaque population séparément (k = 230 tests).

4. Polymorphisme du marqueur mitochondrial de l'hôte

a) Diversité génétique

En tout 4 mitotypes distincts ont été identifiés par séquençage du gène *COX2* de 204 individus échantillonnés au sein de la RBI de Chizé et des sept populations périphériques. L'utilisation de deux enzymes de restriction a ensuite permis de compléter rapidement les résultats sur l'ensemble des individus. Les mitotypes identifiés ici correspondent aux mitotypes AvA, AvD, AvE et AvF observés dans l'étude précédente (voir Chapitre IV). Les mitotypes AvD et AvF sont présents dans toutes les populations étudiées (Figure V-6). Ce sont également les mitotypes les plus fréquents avec des fréquences respectives de 38,1% (31,0% chez les femelles et 48,9% chez les mâles) et 34,5% (40,0% chez les femelles et 26,2% chez les mâles) sur l'ensemble des échantillons de 2004. Le mitotype AvA est présent dans tous les échantillons excepté B, L, PC et PF et présente une fréquence globale de 18,5%

(21,7% chez les femelles et 13,7% chez les mâles). Malgré une fréquence globale plus faible de 8,9% (7,4% chez les femelles et 11,2% chez les mâles), le mitotype AvE est plus largement réparti que le mitotype précédent, puisqu'il est présent dans toutes les (sous-)populations excepté G et PG. Cependant, la répartition des mitotypes n'est pas égale entre toutes les populations. Ainsi certaines seront dominées par un mitotype (par exemple mitotype AvD dans la sous-population B ou AvF dans les populations PC et PF) ou présenteront les différents mitotypes à des fréquences intermédiaires (par exemple les sous-populations M ou O).

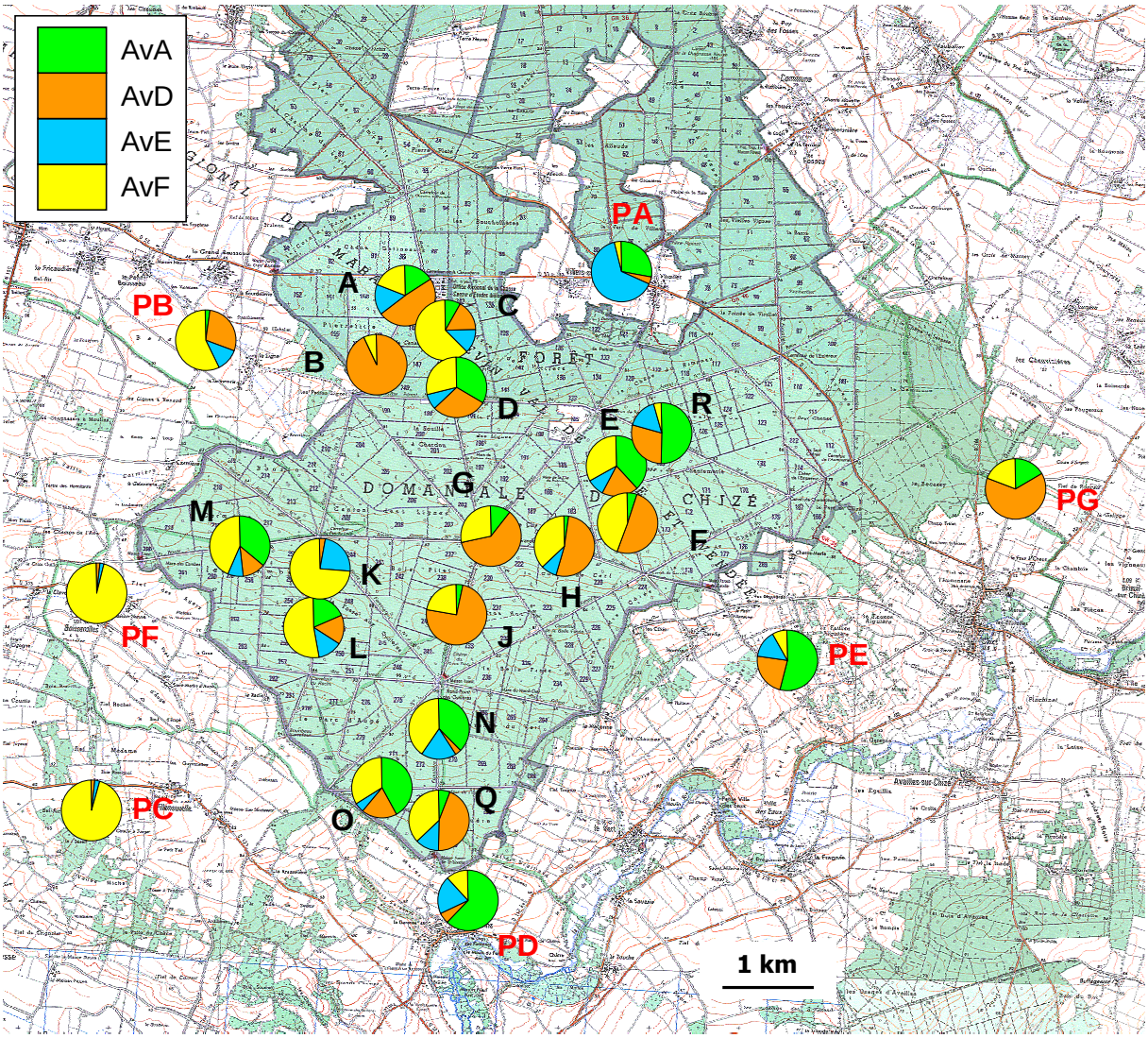


Figure V-6 Distribution des mitotypes (gène *COX2*) au sein des échantillons récoltés en 2004 au sein de la RBI de Chizé et dans les sept populations périphériques.

b) Déséquilibre de liaison

Les tests de déséquilibre d'association montrent un fort déséquilibre d'association entre l'ADN mitochondrial et le statut d'infection par *Wolbachia* (test exact de déséquilibre d'association, $P < 10^{-5}$). En particulier, on peut noter que les associations suivantes sont

majoritaires (Tableau V-7) : AvA-wVulM (D' = 0,887), AvD-wVulC (D' = 0,903), AvE-Non-Infecté (D' = 0,822) et AvF-Non-Infecté (D' = 0,915). Cependant toutes les associations possibles ont été observées au moins une fois, suggérant l'existance de transferts horizontaux de *Wolbachia*.

Tableau V-7 Valeurs de déséquilibre de liaison D' entre le statut d'infection par *Wolbachia* et l'ADN mitochondrial (*COX2*) des femelles *A. vulgare* au sein de la RBI de Chizé et des sept populations périphériques échantillonnées.

	AvA	AvD	AvE	AvF
non-infectée	-0.463	-0.680	**0.822**	**0.915**
*w*VulC	-0.910	**0.903**	-0.789	-0.925
*w*VulM	**0.887**	-0.879	-0.891	-0.896

5. Evolution des fréquences mitochondriales et des prévalences de *Wolbachia*

L'évolution et la stabilité de la composition génétique de plusieurs sous-populations ont été analysées en comparant deux ou plusieurs générations collectées simultanément et/ou à des dates différentes sur un même site.

a) Variation entre adultes et juvéniles

Les fréquences des mitotypes et des prévalences de *Wolbachia* entre adultes et juvéniles ont pu être comparées uniquement dans les six sous-populations (B, H, J, O, Q et R) où des juvéniles ont été trouvés. Les fréquences des associations mitotype-statut d'infection sont présentées sur la figure A-3 en Annexe IV. Les différences de fréquences ont été testées par des tests exacts de différenciation (méthode de Fisher) à l'aide du logiciel Genepop (Raymond & Rousset, 1995). Ces tests prennent en compte à la fois les fréquences mitochondriales et le statut d'infection mais également la proportion des sexes.

Globalement les fréquences des différents types d'associations sont relativement semblables entre générations dans chacune des sous-populations étudiées. Cependant la proportion des sexes n'est pas toujours stable et semble fortement contribuer à augmenter la valeur des tests. C'est le cas des sous-populations B (P = 0,002) et dans une moindre mesure H (P = 0,060) et J (P = 0,106). Globalement, les types d'associations présents chez les adultes sont retrouvés chez les juvéniles avec des fréquences assez proches, en particulier s'ils sont bien représentés. C'est le cas par exemple de l'association AvD-*w*VulC dans les sous-populations B, J, Q et R ou de l'association AvA-*w*VulM dans les sous-populations O et R.

Dans le cas de la sous-population O, on peut remarquer que les fréquences des différents types d'associations sont significativement différentes entre les femelles des deux groupes Op1 et Op2 (test exact de différenciation, P = 0,013). Mais, il n'y a pas de différence significative si l'on considère les deux sexes (P = 0,081). Il n'y a pas non plus de différence

significative lorsqu'on compare les adultes et les juvéniles (Op1 et Op2 poolés ; $P = 0,576$). Les différences observées entre Op1 et Op2 sont attendues si quelques femelles ont choisi chacune de libérer leurs pulli dans l'une ou l'autre des touffes de graminées et si les juvéniles collectés ne se sont pas déplacés en grand nombre d'une touffe d'herbe à l'autre avant d'être collectés.

Les variations de fréquence des mitotypes semblent plus importantes chez les mâles que chez les femelles. Cependant, les effectifs sont très variables d'une génération à l'autre pour les mâles et les variations de fréquence observées sont probablement dues au faible nombre de mâles échantillonnés.

b) Variation au cours des trois années d'échantillonnage

Les fréquences des associations mitotype-statut d'infection par *Wolbachia* ont été suivies dans dix sous-populations de la RBI de Chizé au cours de trois échantillonnages effectués aux printemps 2003, 2004 et 2005. L'ensemble des résultats est présenté sur la Figure A-3 en Annexe IV. A deux reprises, il n'a pas été possible de prélever des mâles sur certaines plateformes au cours des échantillonnages. Il s'agit des sous-populations L lors de l'échantillonnage de 2005 et J lors de l'échantillonnage de 2003. Il n'a également pas été possible de collecter un seul individu sur les plateformes C et E en 2005 malgré des recherches intensives. Globalement, on peut noter que plusieurs sous-populations présentent des fréquences d'association mitotype-statut d'infection par *Wolbachia* relativement stables dans le temps alors que d'autres paraissent beaucoup moins stables.

- **Sous-populations à dynamique plutôt instable :**
  - Sous-population C : Cette sous-population paraît relativement instable. D'une part, il n'a pas été possible de trouver de cloportes en 2005, suggérant une dynamique de population instable. D'autre part, les fréquences mitochondriales des mâles sont assez différentes en 2003 et en 2004 bien que le test exact de Fisher ne soit pas significatif ($P = 0,081$). Dans le cas des femelles, il est difficile de conclure à une instabilité des fréquences des associations étant donné la faiblesse des effectifs.
  - Sous-population E : La taille réduite des effectifs rend difficile la comparaison entre 2003 et 2004 et aucun spécimen n'a été trouvé en 2005. On peut cependant noter que les fréquences mitochondriales sur les mâles semblent assez différentes entre les deux échantillonnages ($P = 0,144$).
  - Sous-population F : Ici également, la taille réduite des effectifs rend difficile la comparaison des trois années d'échantillonnage. Cependant les tests exact de

Fisher indiquent une différence significative entre 2003 et 2004 ($P = 0,019$). Alors que l'association AvD-*w*VulC est dominante chez les femelles en 2004, cela ne semble pas être le cas les deux autres années. Par contre, le mitotype AvF est majoritaire chez les mâles lors des trois échantillonnages.

- Sous-population Q : La sous-population Q présente une grande variété d'associations mitotype-statut d'infection. En tout, neuf associations différentes ont été observées. Malgré des tests non significatifs, les fréquences des associations semblent relativement instables dans cette sous-population. Aucune association ne reste majoritaire les trois années.
- Sous-population M : Sur les trois années, les associations AvA-*w*VulM et AvF-non-infecté semblent être majoritaires. Néanmoins, l'association AvA-*w*VulM semble diminuer en fréquence et laisser place à d'autres associations minoritaires (essentiellement des femelles non infectées). La variabilité génétique de cette sous-population au cours du temps semble intermédiaire entre les sous-populations stables et instables.

- **Sous-populations à dynamiques plutôt stables :**
  - Sous-population G : Cette sous-population parait relativement stable avec les associations AvD-*w*VulC et AvF-non infecté bien représentées au cours des trois années échantillonnées. La prévalence de *w*VulM semble diminuer au cours des années, laissant place à *w*VulC. Les mitotypes observés chez les mâles sont concordants avec ceux observés chez les femelles (mitotypes majoritaires AvD et AvF).
  - Sous-population H : Cette sous-population parait moins stable que la précédente. Néanmoins, on peut noter que l'association AvD-*w*VulC reste dominante parmi les femelles au cours des trois années, excepté quelques fluctuations. Les autres associations observées paraissent par contre relativement instables et ne se maintiennent peut-être que par un apport régulier de migrants d'autres sous-populations. Contrairement aux femelles, les fréquences mitochondriales des mâles ne paraissent pas aussi stables. Il est intéressant de noter également que les fréquences mitochondriales des mâles sont assez différentes de celles des femelles. En particulier le mitotype AvA est largement majoritaire chez les mâles alors qu'il est plutôt minoritaire chez les femelles. De même le mitotype AvD majoritaire

chez les femelles parait minoritaire chez les mâles, et est même absent chez les adultes collectés en 2004.

- Sous-population J : La situation est assez similaire à la sous-population précédente, avec une association AvD-*w*VulC majoritaire les trois années. D'autres associations minoritaires sont également présentes mais elles semblent instables au cours du temps chez les femelles. Par contre, les fréquences mitochondriales des mâles sont plus proches de celles des femelles que dans le cas précédent. En effet le mitotype AvD est majoritaire aussi bien chez les mâles que chez les femelles.
- Sous-population K : Cette sous-population apparemment non infectée par *Wolbachia* parait présenter une relative stabilité des fréquences mitochondriales. En effet, on retrouve les mitotypes AvE (minoritaire) et AvF (majoritaire) à des fréquences assez comparables au cours des trois années. Il semble toutefois, que le mitotype AvD observé uniquement en 2003 chez les deux sexes et en 2004 chez les mâles, diminue en fréquence entre 2003 et 2005.
- Sous-population O : Les fréquences des associations mitotype-statut d'infection sont remarquablement stables chez les femelles comme chez les mâles dans cette sous-population y compris pour les associations minoritaires. Les associations AvD-*w*VulC et AvA-*w*VulM semblent toutefois diminuer en fréquence au profit de l'association AvF-non infecté.

6. Tests de neutralité et détection de goulôt d'étranglement démographiques

a) Tests de goulots d'étranglement :

Les tests de goulots d'étranglements ont été réalisés à l'aide du logiciel Bottleneck *v.* 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999). Trois modèles de mutation ont été utilisés successivement (IAM, SMM et TPM) et deux tests statistiques distincts ont également été utilisés : test des signes (Cornuet & Luikart, 1996) et test de Wilcoxon (Luikart & Cornuet, 1998). L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau V-8. La sous-population E présente un effectif (N = 9) inférieur au minimum requis pour effectuer les tests et n'a donc pas été analysée. Les tests des signes sont peu puissants et n'ont pas permis de détecter d'excès ou de déficit de diversité génique dans aucun échantillon, que ce soit dans la RBI de Chizé ou dans les populations périphériques. Au sein de la RBI de Chizé, huit échantillons d'adultes sur les neuf analysés (C, D, F, G, H, K, M, O et Q) présentent un excès de diversité génique sous le modèle IAM au seuil de 5%. On peut noter que le seul échantillon (J) qui ne présente pas d'excès significatif

est aussi l'échantillon dont l'effectif est le plus faible (N = 12). On peut se demander si, pour cet échantillon, le nombre d'individus génotypés est suffisant pour détecter les traces de goulot d'étranglement avec les tests utilisés, d'autant plus que l'analyse de l'échantillon de juvéniles Jp montre un excès significatif de diversité génique (P = 0,016). Parmi les six échantillons de juvéniles, quatre présentent également des excès significatifs de diversité génique et les deux autres échantillons (Hp et Op1) présentent des excès de diversité génique presque significatif (P = 0,078 dans les deux cas). Des traces de goulots d'étranglement démographiques étaient attendues dans les sous-populations de la RBI de Chizé du fait de l'historique de la RBI de Chizé (fondation des sous-populations il y a au maximum une cinquantaine d'années et dynamique de métapopulation).

Parmi les populations périphériques, quatre (PA, PB, PE, PF et PG) présentent également des excès significatifs de diversité génique au seuil de 5%. On peut noter que PD présente un excès de diversité génique presque significatif (P = 0,078). Aucun déficit ou excès de diversité génique n'est observé sous les autres modèles de mutation (SMM et TPM) excepté dans la population PE qui présente un déficit de diversité génique sous un modèle SMM.

Tableau V-8 Probabilités associées aux tests de détection de goulots d'étranglements réalisés sur les cinq marqueurs microsatellites au sein des sous-populations de la RBI de Chizé et des sept populations périphériques étudiées. Trois modèles de mutation ont été testés à l'aide de tests des signes et de tests de Wilcoxon. Les valeurs significatives sont indiquées en gras. Les tests des signes ne testent que les excès de diversité génique. * la taille de l'échantillon E est inférieure au minimum requis pour effectuer les tests et n'a donc pas été analysée. La taille des échantillons est rappelée entre parenthèse.

Echantillons	IAM			TPM			SMM		
	Test des signes	Test de Wilcoxon		Test des signes	Test de Wilcoxon		Test des signes	Test de Wilcoxon	
		Excès	Deficit		Excès	Déficit		Excès	Déficit
Adultes, RBI de Chizé									
C (19)	0,070	**0,016**	1,000	0,334	0,406	0,688	0,324	0,594	0,500
*E (9)**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F (15)	0,070	**0,016**	1,000	0,320	0,078	0,953	0,682	0,312	0,891
G (19)	0,309	**0,031**	0,984	0,322	0,313	0,891	0,324	0,313	0,891
H (16)	0,069	**0,016**	1,000	0,650	0,594	0,500	0,665	0,688	0,406
J (12)	0,638	0,313	0,891	0,305	0,688	0,406	0,300	0,688	0,406
K (14)	0,066	**0,016**	1,000	0,662	0,078	0,953	0,678	0,313	0,891
M (15)	0,314	**0,031**	0,984	0,667	0,406	0,688	0,675	0,594	0,500
O (18)	0,076	**0,016**	0,031	0,337	0,109	0,922	0,681	0,406	0,688
Q (14)	0,068	**0,016**	1,000	0,675	0,406	0,688	0,322	0,688	0,813
Juvéniles, RBI de Chizé									
Bp (20)	0,062	**0,016**	1,000	0,652	0,406	0,688	0,669	0,500	0,594
Hp (21)	0,322	0,078	0,953	0,337	0,594	0,500	0,330	0,891	0,313
Jp (23)	0,071	**0,016**	1,000	0,681	0,500	0,594	0,661	0,594	0,500
Op1 (15)	0,305	0,078	0,953	0,321	0,594	0,500	0,318	0,594	0,500
Op2 (19)	0,334	**0,031**	0,984	0,338	0,500	0,594	0,321	0,500	0,594
Qp (18)	0,075	**0,016**	1,000	0,325	0,688	0,406	0,093	0,922	0,109
Populations périphériques									
PA (19)	0,069	**0,016**	1,000	0,677	0,078	0,953	0,681	0,109	0,922
PB (23)	0,321	**0,031**	0,984	0,676	0,500	0,594	0,339	0,594	0,500
PC (23)	0,680	0,406	0,688	0,331	0,922	0,109	0,331	0,922	0,109
PD (22)	0,328	0,078	0,953	0,331	0,953	0,078	0,323	0,953	0,078
PE (22)	0,338	**0,031**	0,984	0,092	0,953	0,078	0,091	0,969	**0,047**
PF (23)	0,073	**0,016**	1,000	0,335	0,891	0,313	0,093	0,953	0,078
PG (22)	0,328	**0,047**	0,969	0,325	0,922	0,109	0,334	0,922	0,109

b) Tests de neutralité sur l'ADN mitochondrial :

Les relations phylogénétiques de ces mitotypes avaient été présentées dans le Chapitre IV, Figure IV-3. Les tests de neutralité avaient alors montré qu'ils présentent une forte divergence génétique, compatible avec un modèle d'évolution fréquence-dépendante. Les tests de Fu (Fu, 1997) réalisés avec le logiciel NeutralityTest (Li & Fu, submitted) sont tous significatifs et confirment les résultats obtenus au chapitre précédent (Tableau V-9). La divergence de ces mitotypes anciens n'est donc pas informative sur les phénomènes de migration entre (sous-)populations. Une analyse du polymorphisme à l'échelle nucléotidique n'est donc pas justifiée à une échelle géographique aussi réduite (hormis pour les tests de

neutralité); les données de polymorphisme nucléotidique ne sont donc pas présentées. Seules les fréquences haplotypiques sont prises en compte dans l'ensemble des analyses.

Tableau V-9 Tests de Fu appliqués sur les séquences de Cytochrome Oxydase II des échantillons de la RBI de Chizé et des populations périphériques. *N* : nombre de séquences, *Fs* : statistique de Fu, *P* : probabilité d'un déficit du nombre d'haplotypes étant donné le nombre de mutations observées. *** : $P < 2.10^{-5}$. Tous les tests sont significatifs après corrections de Bonferroni.

Echantillons	*N*	*Fs*	*P*
RBI de Chizé	58	∞	***
PA	22	∞	***
PB	21	15,86	***
PC	20	6,393	0,016
PD	24	15,43	***
PE	21	11,34	0,001
PF	19	6,458	0,019
PG	19	10,3	0,002
Total	**204**	∞	***

7. Structuration génétique de l'hôte

a) Marqueurs nucléaires

Tests exacts de différenciation : Les tests exacts de différenciation génique (Tableau V-10) indiquent une structuration génétique globale hautement significative sur les loci microsatellites, à la fois pour les échantillons de la RBI de Chizé et pour les populations périphériques. Cependant, les résultats obtenus sur les échantillons de la RBI de Chizé sont à interpréter avec prudence, car les résultats détaillés locus par locus indiquent que la différenciation observée est essentiellement due au locus *Av6*. Lors des tests locus par locus, aucun locus ne montre de structuration significative, excepté le locus *Av6* qui présente une structuration hautement significative. Les analyses réalisées sans le locus *Av6* indiquent une structuration non significative pour les échantillons d'adultes de la RBI de Chizé ($P = 0,263$). Cependant, la structuration génétique est significative pour les échantillons de juvéniles de la RBI ($P = 0.024$) en prenant en compte ou non le locus *Av6*. La structuration des populations périphériques est également hautement significative en prenant en compte ou non le locus *Av6*.

Tableau V-10 Tests exacts de différenciation génique globaux appliqués aux loci microsatellites. * indique P < 10^{-4}**

	Tous loci compris			Locus *Av6* exclu		
	χ^2	dl	*P*	χ^2	dl	*P*
Echantillons d'adultes de la RBI de Chizé	∞	**10**	***	**10,0**	**8**	**0,263**
Echantillons de Juvéniles de Chizé	**37,5**	**10**	***	**17,6**	**8**	**0,024**
Populations périphériques	∞	**10**	***	∞	**8**	***
Echantillons d'adultes de Chizé et populations périphériques	∞	**10**	***	∞	**8**	***

Les tests exacts de différenciation génique par paires de populations confirment une structuration génétique plus importante entre les populations périphériques qu'entre les échantillons d'adultes de la RBI (Tableau V-10). En ne considérant que les échantillons d'adultes, 70 des 136 comparaisons effectuées sont significatives au seuil de 5% avant corrections séquentielles de Bonferroni et 37 au seuil de 5% après corrections séquentielles de Bonferroni. Cependant, ces 37 différences significatives ne se trouvent que parmi les comparaisons entre populations périphériques (15 comparaisons significatives sur 21) et les comparaisons entre les populations périphériques et les échantillons d'adultes de la RBI (22 comparaisons significatives sur 70). Aucune comparaison n'est significative entre les sous-populations de la RBI, suggérant fortement une structuration plus faible dans la RBI de Chizé. Les tests exacts de différenciation semblent indiquer une structuration génétique un peu plus importante entre les échantillons de juvéniles de la RBI qu'entre les échantillons d'adultes (Tableaux V-11 et V-12). En effet, 7 des 15 comparaisons entre échantillons de juvéniles (soit 47%) sont significatives avant corrections de Bonferroni (quatre après corrections de Bonferroni) contre 6 des 45 comparaisons (soit 13%) entre échantillons d'adultes (respectivement aucune). Les 47% de comparaisons significatives avant corrections séquentielles de Bonferroni ne correspondent pas à l'attendu de 5% de comparaisons significatives dues au hasard. La forte réduction du nombre de valeurs significatives après corrections de Bonferroni s'explique par la perte de puissance statistique qu'entraine cette procédure.

Tableau V-11 Différenciation génétique des loci microsatellites pour les échantillons d'adultes collectés en 2003 dans la RBI de Chizé et dans les populations périphériques : Valeurs F_{ST} par paires de populations, estimées selon Weir et Cockerham (1984) dans la demi-matrice supérieure et les probabilités associées aux tests exacts de différenciation génique dans la demi matrice inférieure. Les valeurs F_{ST} ont été testées par 10000 permutations des individus entre populations. Les valeurs significatives au seuil 5% avant corrections de Bonferroni sont indiquées en gras. Les valeurs significatives après corrections séquentielles de Bonferroni sont soulignées.

	C	E	F	G	H	J	K	M	O	Q	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG
C		0,006	-0,008	0,003	**0,037**	-0,009	0,012	**0,021**	**0,021**	**0,047**	**0,020**	**0,019**	0,003	0,008	0,005	**0,020**	**0,04**
E	0,466		0,019	0,002	**0,044**	-0,008	0,018	0,008	0,020	0,013	**0,026**	0,014	**0,027**	0,016	0,011	0,020	0,019
F	0,567	0,257		0,002	**0,030**	-0,015	0,007	0,020	**0,020**	**0,048**	**0,029**	**0,022**	0,005	0,009	0,018	0,013	**0,042**
G	0,241	0,712	0,451		0,007	-0,003	-0,008	0,000	0,003	0,015	**0,014**	**0,024**	0,008	0,001	0,010	**0,016**	**0,019**
H	0,001	0,078	**0,028**	0,193		**0,028**	-0,007	0,002	-0,006	0,007	**0,032**	**0,038**	**0,029**	0,006	0,017	**0,019**	**0,037**
J	0,475	0,967	0,928	0,565	0,063		-0,001	0,003	0,013	**0,027**	**0,020**	0,008	0,003	0,004	0,006	0,009	0,016
K	0,065	0,312	0,155	0,300	0,774	0,375		-0,012	-0,005	0,012	0,017	0,019	0,015	0,008	0,009	0,005	0,018
M	**0,016**	0,576	0,051	0,145	0,278	0,381	0,902		-0,004	-0,009	**0,020**	**0,029**	**0,031**	0,012	0,006	0,010	0,010
O	**0,026**	0,330	**0,048**	0,139	0,208	0,171	0,123	0,550		0,011	**0,025**	**0,032**	**0,029**	0,012	0,010	0,009	**0,030**
Q	**0,000**	0,346	**0,002**	0,060	0,178	0,080	0,102	0,615	0,086		**0,050**	**0,066**	**0,059**	0,009	**0,021**	**0,040**	**0,027**
PA	**0,000**	**0,023**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,023**	**0,027**	**0,035**	**0,023**	**0,034**	**0,031**
PB	**0,000**	0,114	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,026**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		0,012	**0,038**	**0,024**	**0,016**	**0,044**
PC	0,056	0,075	0,080	0,105	**0,006**	0,058	**0,012**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,002**		0,009	**0,016**	**0,020**	**0,049**
PD	0,159	0,513	0,341	0,569	0,314	0,254	0,215	**0,009**	**0,007**	0,096	**0,000**	**0,000**	0,061		0,004	**0,023**	**0,035**
PE	0,067	0,252	**0,040**	0,067	0,053	0,091	0,134	0,083	**0,037**	**0,004**	**0,000**	**0,000**	**0,002**	0,079		0,013	**0,024**
PF	**0,005**	0,142	0,150	**0,020**	**0,009**	0,114	0,073	**0,027**	**0,004**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,005**		**0,038**
PG	**0,000**	**0,009**	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,012**	**0,000**	**0,004**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	

Tableau V-12 Différenciation génétique des loci microsatellites pour les échantillons de juvéniles collectés dans la RBI de Chizé: Valeurs F_{ST} par paires de populations, estimées selon Weir et Cockerham (1984) dans la demi-matrice supérieure et les probabilités associées aux tests exacts de différenciation génique dans la demi matrice inférieure. Les valeurs F_{ST} ont été testées par 10000 permutations des individus entre populations. Les valeurs significatives au seuil 5% avant corrections de Bonferroni sont indiquées en gras. Les valeurs significatives après corrections séquentielles de Bonferroni sont soulignées.

	Bp	Hp	Jp	Op1	Op2	Qp
Bp		**0,025**	**0,031**	0,001	0,015	0,012
Hp	**0,002**		0,004	-0,001	0,006	-0,010
Jp	**0,000**	0,106		-0,001	0,012	0,003
Op1	**0,048**	0,232	0,373		-0,009	-0,012
Op2	**0,001**	**0,007**	**0,034**	0,559		-0,004
Qp	**0,025**	0,533	0,235	0,902	0,265	

***F*-statistiques :** Les indices F_{ST} ont été calculés globalement et par paire de populations à l'aide de l'estimateur de Weir et Cockerham (1984). Les F_{ST} (Tableau V-13) confirment les résultats obtenus avec les tests exacts de différenciation et indiquent une plus faible structuration génétique dans la RBI de Chizé que dans les populations périphériques. A nouveau, le locus *Av6* se comporte différemment des autres loci microsatellites. Lorsqu'il est pris en compte, les sous-populations de la RBI de Chizé présentent un F_{ST} significatif de 0,010. Cependant, si on exclut le locus *Av6*, la structuration devient non significative et le F_{ST} tombe à zéro. Les échantillons de juvéniles ne semblent pas indiquer une structuration génétique différente de celles des adultes dans la RBI de Chizé sur la base des valeurs F_{ST} et présentent un F_{ST} global comparable à celui des adultes, que l'on prenne ou non en compte le locus *Av6*. Dans les populations périphériques, le locus *Av6* ne présente pas une structuration plus importante que celle des autres loci. Le F_{ST} global y est de 0,025 en prenant en compte le locus *Av6* et de 0,024 en l'excluant. Dans les deux cas, la structuration est hautement significative.

Les valeurs F_{ST} par paire de (sous-)populations (Tableau V-11) sont relativement faibles aussi bien dans la RBI de Chizé que dans les populations périphériques et atteignent un maximum de 0,066. Cependant, on peut noter une proportion de comparaisons significatives plus importantes entre les populations périphériques (17 comparaisons significatives sur 21 ; deux significatives après correction de Bonferroni) qu'entre les sous-populations de la RBI de Chizé (10 comparaisons significatives sur 45, aucune n'est significative après correction de Bonferroni). Encore une fois, les tests indiquent une structuration plus importante des échantillons de juvéniles (sept comparaisons significatives sur 15 avant correction de Bonferroni et 4 sur 15 après corrections) que des échantillons d'adultes (Tableaux V-11 et V-12)..

Tableau V-13 *F*-statistiques appliquées aux échantillons de la RBI de Chizé et aux populations périphériques. Les valeurs ont été testées par 10000 permutations. *** $P < 10^{-5}$.

Avec le locus *Av6*	F_{ST}	(*P*)	F_{IS}	(*P*)	F_{IT}	(*P*)
Echantillons d'adultes de la RBI de Chizé	0,0094	(0,012)	0,0234	(0,100)	0,0326	(0,038)
Echantillons de Juvéniles de Chizé	0,0062	(0,068)	0,0437	(0,022)	0,0496	(0,009)
Populations périphériques	0,0254	***	0,0521	(0,002)	0,0762	***
Echantillons d'adultes de Chizé et populations périphériques	0,0185	***	0,0381	(0,001)	0,0558	***
Sans le locus *Av6*	F_{ST}	(*P*)	F_{IS}	(*P*)	F_{IT}	(*P*)
Echantillons d'adultes de la RBI de Chizé	0,0000	(0,474)	0,0193	(0,147)	0,0194	(0,148)
Echantillons de Juvéniles de Chizé	0,0038	(0,182)	0,0235	(0,148)	0,0272	(0,112)
Populations périphériques	0,0241	***	0,0251	(0,101)	0,0486	(0,004)
Echantillons d'adultes de Chizé et populations périphériques	0,0129	***	0,0222	(0,047)	0,0348	(0,003)

b) Marqueur mitochondrial

Les échantillons d'adultes collectés en 2003, 2004 et 2005 dans la RBI de Chizé présentent des structurations génétiques très similaires. Aussi, afin de ne pas alourdir inutilement ce chapitre, seuls les résultats des analyses de structuration sur les échantillons d'adultes collectés en 2004 sont présentés ici.

Tests exacts de différenciation : Les tests exacts de différenciation indiquent une structuration significative dans les échantillons analysés aussi bien chez les juvéniles que les adultes. Les tests globaux appliqués successivement aux échantillons d'adultes collectés en 2004 dans la RBI de Chizé, aux échantillons de juveniles collectés dans la RBI et aux populations périphériques, sont tous hautement significatifs ($P < 10^{-4}$). 37 comparaisons sur les 120 effectuées sur les échantillons d'adultes collectés dans la RBI de Chizé sont significatives après corrections de Bonferroni (soit 30,8% ; Tableau V-14). La proportion de comparaisons significatives après correction de Bonferroni est également importante parmi les échantillons de juvéniles (14 comparaisons sur 21, soit 66,7%, Tableau V-15). Sur la base des tests exacts de différenciation, la structuration observée sur les échantillons de juvéniles est comparable à celle observée sur les échantillons d'adultes collectés sur les mêmes sites. La structuration génétique du marqueur mitochondrial semble plus importante entre les populations périphériques qu'entre les sous-populations de la RBI de Chizé, puisque 17 comparaisons sur 21 sont significatives après corrections de Bonferroni (soit 81,0%).

Tableau V-14 Différenciation génétique du marqueur mitochondrial pour les échantillons de la RBI de Chizé collectés en 2004 et des populations périphériques : valeurs F_{ST} par paires de populations, estimées selon Weir et Cockerham (1984) dans la demi-matrice supérieure et les probabilités associées aux tests exacts de différenciation génique dans la demi matrice inférieure. Les valeurs F_{ST} ont été testées par 10000 permutations des individus entre populations. Les valeurs significatives au seuil 5% avant corrections de Bonferroni sont indiquées en gras. Les valeurs significatives après corrections séquentielles de Bonferroni sont soulignées.

	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N	O	Q	R	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG
A		**0,219**	**0,159**	0,020	**0,066**	0,038	0,005	0,016	**0,086**	**0,117**	**0,303**	**0,120**	**0,155**	**0,098**	-0,005	**0,083**	**0,251**	**0,116**	**0,546**	**0,220**	**0,132**	**0,562**	0,011
B	**0,001**		**0,570**	**0,401**	**0,492**	**0,330**	**0,183**	**0,242**	0,021	**0,504**	**0,697**	**0,538**	**0,561**	**0,467**	**0,270**	**0,470**	**0,666**	**0,449**	**0,882**	**0,610**	**0,496**	**0,888**	**0,129**
C	**0,011**	**0,000**		**0,093**	**0,082**	0,083	**0,184**	**0,109**	**0,392**	-0,021	0,011	0,047	**0,078**	**0,107**	**0,078**	**0,278**	**0,357**	-0,015	**0,199**	**0,310**	**0,280**	**0,214**	**0,259**
D	0,268	**0,000**	0,055		-0,036	0,066	0,068	**0,074**	**0,231**	0,033	**0,239**	-0,004	0,029	-0,018	0,036	0,027	**0,234**	**0,093**	**0,488**	**0,095**	0,042	**0,506**	**0,088**
E	0,071	**0,000**	0,101	0,924		**0,111**	**0,130**	**0,124**	**0,315**	0,017	**0,217**	-0,033	-0,012	-0,036	**0,076**	0,036	**0,225**	**0,104**	**0,480**	0,061	0,035	**0,499**	**0,157**
F	0,065	**0,002**	0,063	**0,047**	**0,013**		-0,012	-0,029	**0,130**	**0,079**	**0,247**	**0,130**	**0,195**	**0,135**	-0,019	**0,235**	**0,419**	0,027	**0,496**	**0,352**	**0,269**	**0,515**	0,048
G	0,150	**0,007**	**0,003**	0,058	**0,006**	0,586		-0,009	0,032	**0,153**	**0,353**	**0,175**	**0,236**	**0,151**	-0,001	**0,189**	**0,410**	**0,118**	**0,582**	**0,335**	**0,235**	**0,598**	-0,017
H	0,110	**0,001**	**0,038**	**0,008**	**0,001**	0,709	0,253		**0,093**	**0,101**	**0,251**	**0,152**	**0,205**	**0,152**	-0,024	**0,219**	**0,371**	0,048	**0,465**	**0,339**	**0,258**	**0,480**	0,039
J	**0,037**	0,266	**0,000**	**0,002**	**0,000**	0,063	0,298	0,070		**0,345**	**0,549**	**0,371**	**0,416**	**0,321**	**0,116**	**0,319**	**0,539**	**0,294**	**0,771**	**0,483**	**0,368**	**0,783**	0,016
K	**0,011**	**0,000**	0,779	0,227	0,402	**0,020**	**0,001**	**0,004**	**0,000**		**0,058**	-0,005	0,021	0,041	**0,064**	**0,189**	**0,286**	0,009	**0,254**	**0,213**	**0,190**	**0,269**	**0,214**
L	**0,000**	**0,000**	0,105	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,018**		**0,161**	**0,162**	**0,236**	**0,213**	**0,419**	**0,423**	**0,066**	**0,153**	**0,421**	**0,406**	**0,166**	**0,418**
M	**0,004**	**0,000**	0,145	0,478	0,885	**0,004**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	0,523	**0,001**		-0,021	-0,020	**0,105**	**0,106**	**0,265**	**0,087**	**0,391**	**0,106**	**0,096**	**0,408**	**0,216**
N	**0,000**	**0,000**	**0,024**	**0,049**	0,273	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,152	**0,000**	0,458		0,006	**0,149**	**0,111**	**0,199**	**0,128**	**0,401**	**0,078**	**0,093**	**0,417**	**0,272**
O	**0,007**	**0,000**	**0,017**	0,710	0,953	**0,005**	**0,002**	**0,000**	**0,000**	0,152	**0,000**	0,760	0,095		**0,108**	0,052	**0,258**	**0,132**	**0,434**	**0,068**	**0,046**	**0,449**	**0,174**
Q	0,442	**0,000**	0,120	0,090	**0,023**	0,433	0,235	0,798	**0,028**	0,061	**0,000**	**0,007**	**0,001**	**0,002**		**0,166**	**0,304**	0,032	**0,451**	**0,280**	**0,205**	**0,468**	0,042
R	**0,034**	**0,000**	**0,000**	0,102	0,105	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,010**	**0,001**	0,019	**0,000**		**0,194**	**0,276**	**0,667**	0,025	-0,026	**0,681**	**0,169**
PA	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,001**		**0,361**	**0,721**	**0,195**	**0,200**	**0,734**	**0,415**
PB	**0,006**	**0,000**	0,538	**0,006**	**0,002**	0,145	**0,002**	0,202	**0,000**	0,101	**0,009**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	0,258	**0,000**	**0,000**		**0,239**	**0,334**	**0,289**	**0,252**	**0,193**
PC	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,009**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**		**0,647**	**0,618**	-0,022	**0,610**
PD	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,011**	0,074	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,015**	**0,042**	**0,011**	**0,000**	0,106	**0,001**	**0,000**	**0,000**		-0,002	**0,660**	**0,330**
PE	**0,008**	**0,000**	**0,000**	0,083	0,139	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,014**	**0,002**	**0,031**	**0,000**	0,874	**0,001**	**0,000**	**0,000**	0,324		**0,632**	**0,221**
PF	**0,000**	**0,000**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,003**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	1,000	**0,000**	**0,000**		**0,623**
PG	0,050	**0,010**	**0,000**	**0,016**	**0,002**	0,128	0,556	**0,016**	0,304	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,023**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	

Tableau V-15 Différenciation génétique du marqueur mitochondrial pour les échantillons de juvéniles de la RBI de Chizé : valeurs F_{ST} par paires de populations, estimées selon Weir et Cockerham (1984) dans la demi-matrice supérieure et les probabilités associées aux tests exacts de différenciation génique dans la demi matrice inférieure. Les valeurs F_{ST} ont été testées par 10000 permutations des individus entre populations. Les valeurs significatives au seuil 5% avant corrections de Bonferroni sont indiquées en gras. Les valeurs significatives après corrections séquentielles de Bonferroni sont soulignées.

	Bp	Hp	Jp	Qp	Op1	Op2	Rp
Bp		0,024	**0,292**	**0,258**	**0,604**	**0,524**	**0,514**
Hp	0,267		0,118	0,083	**0,451**	**0,396**	**0,413**
Jp	**0,000**	0,056		-0,043	**0,214**	**0,242**	**0,313**
Qp	**0,000**	0,096	0,896		**0,193**	**0,207**	**0,271**
Op1	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,002**		0,051	**0,110**
Op2	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,063		-0,012
Rp	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,009**	0,351	

***F*-statistiques :** Des analyses de variance moléculaire (AMOVA) ont été réalisées sur les données du marqueur mitochondrial afin d'estimer les niveaux de structuration génétique au sein de la RBI de Chizé et dans les populations périphériques. Les F_{ST} globaux confirment l'existence d'une structuration forte et hautement significative au sein de la RBI de Chizé et des populations périphériques (Tableau V-16). La structuration observée sur les échantillons d'adultes de la RBI de Chizé est assez élevée ($F_{ST} = 0,167$) et hautement significative. La structuration entre échantillons de juvéniles est plus élevée et atteint 0,298. Cependant, l'analyse des échantillons d'adultes collectés sur les mêmes sites en 2004 (B, H, J, O et Q) montre un niveau de structuration plus faible ($F_{ST} = 0,208$; $P < 10^{-5}$) que celles des juvéniles. Cette différence de structuration peut indiquer un effet de la dispersion plus importante chez les adultes que chez les juvéniles. La structuration est, par contre, plus importante dans les populations périphériques puisque le F_{ST} atteint ici 0,437. Les comparaisons par paires de populations confirment la forte structuration génétique des populations périphériques avec des valeurs de F_{ST} très variables, allant de -0,022 à 0,734 (Tableau V-14).

Tableau V-16 AMOVA appliquées au marqueur mitochondrial sur les échantillons collectés dans la RBI de Chizé en 2003, 2004 et 2005 et sur les populations périphériques. *** $P < 10^{-5}$.

		Degrés de liberté	Somme des carrés	Composantes de la variance	% de variance	F_{ST}
RBI de Chizé (échantillons d'adultes collectés en 2004)	V. inter.	15	29,45	0,059	16,74	0,167
	V. intra.	434	128,30	0,296	83,26	***
Juvéniles de la RBI de Chizé	V. inter.	6	16,32	0,099	29,83	0,298
	V. intra.	171	39,99	0,234	70,17	***
Populations périphériques	V. inter.	6	38,26	0,16	43,71	0,437
	V. intra.	265	54,49	0,206	56,29	***
Ensemble Populations périphériques et RBI de chizé (échantillons 2004)	V. inter.	22	71,35	0,095	26,7	0,267
	V. intra.	699	182,79	0,262	73,3	***

V. intra. = Variante intrapopulation ; V. inter. = Variante interpopulation.

c) Tests de Mantel

Des tests de Mantel simples et partiels ont été réalisés afin de déterminer les facteurs influençant la structuration génétique au sein de la RBI de Chizé et des populations périphériques. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau V-17. La structuration génétique des loci microsatellites ayant été analysées au sein de la RBI de Chizé sur les échantillons d'adultes collectés en 2003, les tests de Mantel partiels incluant la structuration génétique nucléaire d'*A. vulgare* n'ont été réalisés que sur les échantillons collectés en 2003 dans la RBI de Chizé et ceux des populations périphériques.

Echantillons de 2003 de la RBI de Chizé : Les tests de Mantel n'indiquent pas d'isolement par la distance significatif entre les sous-populations de la RBI de Chizé que ce soit sur les loci microsatellites ($r^2 = 0{,}008$; $P = 0{,}955$; Figure V-7), sur le marqueur mitochondrial ($r^2 = -0{,}107$; P 0,487 ; Figure V-8) ou sur les prévalences de *Wolbachia* ($r^2 = -0{,}098$; $P = 0{,}957$). Ils montrent par contre une étroite relation entre la structuration du marqueur mitochondrial et les prévalences de *Wolbachia* ($r^2 = 0{,}785$; $P = 0{,}0001$). Ce dernier résultat est facilement expliqué par le déséquilibre d'association existant entre ces deux marqueurs (voir Chapitre IV). Il n'existe pas de relation significative de la structuration des loci microsatellites avec celles du marqueur mitochondrial ($r^2 = -0{,}286$; $P = 0{,}059$) ou celle des prévalences de *Wolbachia* ($r^2 = 0{,}314$; $P = 0{,}628$). Les tests partiels de Mantel confirment la corrélation entre différenciation du

Tableau V-17 Tests de Mantel simples et partiels effectués sur les données des échantillons de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et les sept populations périphériques. Les distances géographiques ont été ln-transformées et les F_{ST} transformés en $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Prévalence *Wolbachia* correspond aux $F_{ST}/(1-F_{ST})$ calculés sur les prévalences de *Wolbachia*.

			Echantillons 2003 de la RBI			Populations périphériques		
Variable dépendante	Variable explicative	Variable contrôlée	r^2	β	P	r^2	β	P
F_{ST} microsatellites	Distance géographique		0,008	0,000	0,955	**0,580**	**0,018**	**0,006**
F_{ST} ADN mitochondrial	Distance géographique		-0,107	-0,054	0,487	**0,526**	**1,134**	**0,014**
	Prévalence *Wolbachia*		**0,848**	**0,320**	**0,000**	0,090	0,088	0,704
	F_{ST} microsatellites		-0,286	-6,374	0,059	0,105	7,338	0,654
Prévalence *Wolbachia*	Distance géographique		-0,098	-0,112	0,957	-0,083	-0,185	0,722
	F_{ST} microsatellites		-0,314	-4,614	0,628	-0,227	-16,291	0,322
	F_{ST} ADN mitochondrial		**0,785**	**2,188**	**0,000**	0,090	0,093	0,711
F_{ST} ADN mitochondrial	Distance géographique	F_{ST} microsatellites	-0,107	-0,053	0,487	**0,526**	**1,510**	**0,007**
	F_{ST} microsatellites	Distance géographique	-0,286	-6,355	0,056	-0,245	-20,949	0,280
Prévalence *Wolbachia*	Distance géographique	F_{ST} microsatellites	-0,098	-0,128	0,551	0,083	0,162	0,795
	F_{ST} microsatellites	Distance géographique	**-0,314**	**-18,515**	**0,035**	-0,220	-19,334	0,345

			Echantillons 2004 de la RBI			Echantillons 2005 de la RBI		
Variable dépendante	Variable explicative	Variable contrôlée	r^2	β	P	r^2	β	P
F_{ST} ADN mitochondrial	Distance géographique		0,039	0,021	0,670	0,001	0,000	0,996
	Prévalence *Wolbachia*		**0,575**	**0,099**	**0,001**	**0,716**	**0,285**	**0,002**
F_{ST} ADN mitochondrial	Distance géographique	Prévalence *Wolbachia*	0,001	0,001	0,987	-0,010	-0,004	0,965
	Prévalence *Wolbachia*	Distance géographique	**0,575**	**0,099**	**0,000**	**0,716**	**0,285**	**0,002**

marqueur mitochondrial et prévalences de *Wolbachia*. Par contre ils indiquent une corrélation négative entre la structuration des loci microsatellites (c'est à dire les flux de gènes) et la structuration des prévalences de *Wolbachia* (r^2 = -0,314 ; P = 0,035).

Echantillons de 2004 et de 2005 de la RBI de Chizé : Les tests de Mantel réalisés sur les deux échantillonnages confirment la corrélation significative entre la structuration du marqueur mitochondrial et la structuration des prévalences de *Wolbachia* (P = 0,001 en 2004 et P = 0,002 en 2005).

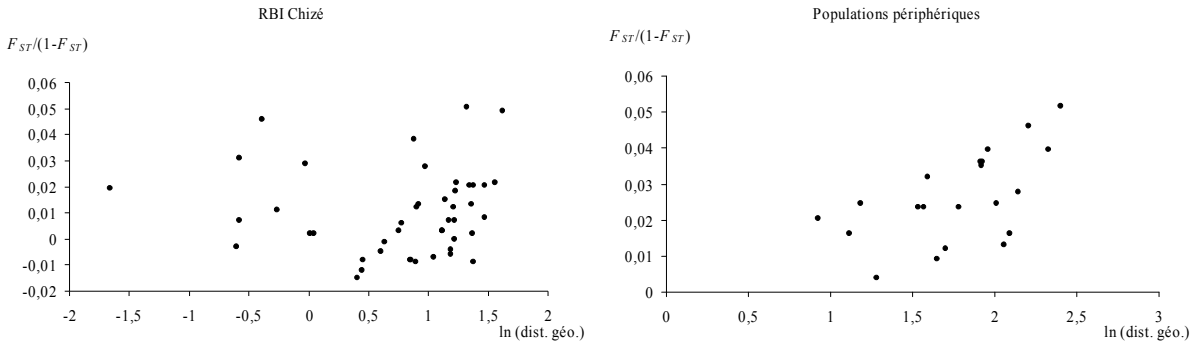


Figure V-7 Relation entre différenciation génétique des marqueurs microsatellites ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) et distance géographique (ln) entre les sous-populations collectées dans la Réserve Biologique Intégrale de Chizé (graphique de gauche) et entre les sept populations périphériques (graphique de droite).

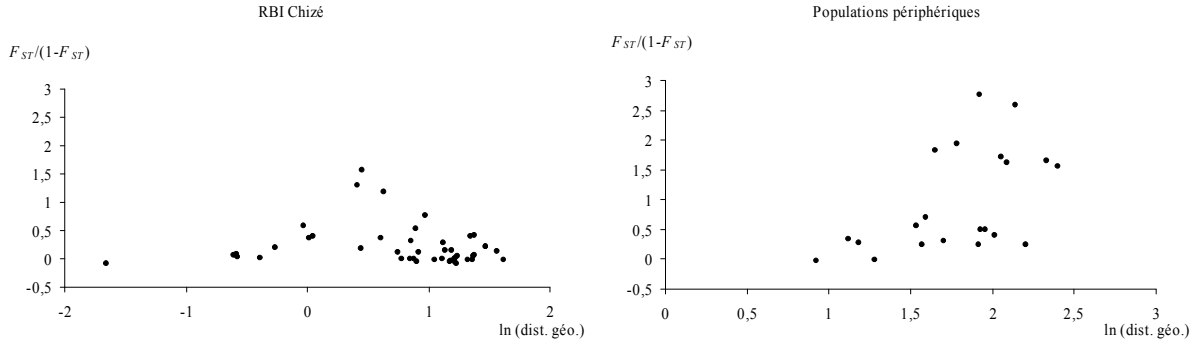


Figure V-8 Relation entre différenciation génétique de l'ADN mitochondrial ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) et distance géographique (ln) entre les sous-populations collectées dans la Réserve Biologique Intégrale de Chizé (échantillonnage de 2003 ; graphique de gauche) et entre les sept populations périphériques (graphique de droite).

Populations périphériques : Le type de structuration observé sur les populations périphériques paraît très différent de la structuration observée dans la RBI de Chizé. En effet, la structuration des loci microsatellites est significativement corrélée aux distances géographiques séparant les populations (r^2 = 0,580 ; P = 0,006 ; Figure V-7) et suggère l'existence d'un isolement par la distance. Le marqueur mitochondrial montre également une structuration compatible avec un modèle d'isolement par la distance (r^2 = 0,526 ; P = 0,014 ; Figure V-8). Par contre la structuration des prévalences de *Wolbachia* n'est corrélée ni aux distances géographiques, ni aux structurations des marqueurs microsatellites et mitochondrial.

Les tests de Mantel partiel confirment ces résultats. L'absence de corrélation entre le marqueur mitochondrial et *Wolbachia* peu facilement être expliquée par le fait qu'une seule population (PD) est fortement infectée par *Wolbachia* parmi les populations périphériques. *Wolbachia* influence donc peu la structuration de ces populations.

D. Discussion

La dynamique de *Wolbachia* semble différente au sein de la métapopulation de la RBI de Chizé et dans les populations périphériques. En effet, les deux souches *Wolbachia* (*w*VulC et *w*VulM) sont relativement abondantes dans les sous-populations de la RBI de Chizé, mais sont beaucoup moins fréquentes dans les populations périphériques. De plus le polymorphisme de l'ADN mitochondrial semble structuré selon un modèle d'isolement par la distance dans les populations périphériques mais pas au sein de la métapopulation de la RBI de Chizé. Les dynamiques de ces deux "ensembles" sont donc à analyser séparément.

1. Système en métapopulation dans la RBI de Chizé

Les deux souches de *Wolbachia* (*w*VulM et *w*VulC) présentent des prévalences élevées dans les sous-populations de la RBI de Chizé (62,9%). Le suivi de leurs prévalences pendant trois ans a montré une grande hétérogénéité dans la dynamique des sous-populations échantillonnées. Deux groupes de sous-populations ont été définis selon la stabilité des fréquences des mitotypes et des prévalences de *Wolbachia*. Le premier groupe comprend des sous-populations présentant des dynamiques stables au cours du temps avec de faibles variations (sous-populations G, H, J, K et O). Le second groupe comprend des sous-populations caractérisées par des dynamiques plutôt instables (sous-populations C, E, F, Q et éventuellement M). Les variations de prévalences de *Wolbachia* entre sous-populations peuvent s'expliquer par des phénomènes de sélection fréquence-dépendante, tels que proposés au Chapitre IV. Cependant, cette hypothèse ne suffit pas à elle seule à expliquer les résultats obtenus car on devrait s'attendre à observer une évolution graduelle des fréquences mitochondriales et des prévalences de *Wolbachia*. Or si une telle évolution semble présente dans les sous-populations G, M et O, elle n'est pas retrouvée dans les populations C, E, F et Q. Une autre explication réside dans un fonctionnement de l'ensemble des sous-populations de la RBI en métapopulation avec des sous-populations "sources" et des sous-populations "puits" (Pulliam, 1988; Pulliam & Danielson, 1991). Les sous-populations sources présentent un taux de croissance supérieur à 1 et envoient un flux d'émigrants vers les sous-populations puits. Une telle dynamique est étroitement liée à la qualité des habitats. Cependant, d'autres facteurs

tels que les facteurs féminisants peuvent induire une telle dynamique en biaisant fortement les sexe-ratios (Hatcher *et al.*, 1999; Hatcher, 2000).

D'après nos relevés d'habitat sur les différents sites, il semble exister un lien entre la stabilité des populations et deux facteurs environnementaux : une bonne ouverture du milieu et un pourcentage important de sol nu (gravier). En effet, les quatre sites dont les dynamiques semblent les plus instables (sous-populations C, E, F, Q), présentent des indices d'ouverture faibles (1 à 3) et les cinq sites les plus stables (sous-populations G, H, J, K et O) ont des indices d'ouverture élevés (de 3 à 5). Le pourcentage de sol nu est également plus important dans le cas des sous-populations les plus stables (0 à 80%, moyenne 40%) que dans le cas des sous-populations les plus instables (0 à 50%, moyenne 14%). Cependant, ce facteur est en partie lié à la proximité des arbres (dont les feuilles couvrent partiellement ou totalement les plateformes à l'automne) et donc à l'ouverture du milieu. De plus la forte variabilité de ce paramètre suggère qu'il n'a pas un effet majeur sur les populations d'*A. vulgare*. Une hypothèse pourrait être qu'une forte ouverture du milieu favorise un microclimat plus chaud et plus sec en permettant au rayonnement solaire de chauffer la plateforme. Un milieu pauvre en litière et en végétation éviterait une accumulation d'humidité importante en particulier l'hiver, qui pourrait être défavorable à *A. vulgare* (Corré, 2007). Cependant, des analyses plus approfondies et sur un plus grand nombre de sites sont nécessaires pour tirer des conclusions.

Un autre argument en faveur d'une dynamique en métapopulation est que la dynamique des sous-populations puits est gouvernée par des phénomènes d'extinction suivis de recolonisation. Or il n'a pas été possible de récolter d'individus dans deux sous-populations (C et E) en 2005, suggérant l'existence d'extinctions locales. Dans le cas de la sous-population C, la présence d'un stock de bois sous bâche couvrant une grande partie de la plateforme a peut-être eu un impact négatif sur le fonctionnement de cette sous-population. L'enlèvement du stock de bois en 2005 est peut-être à l'origine d'une perturbation supplémentaire de cette sous-population. On peut donc raisonnablement supposer que les sous-populations G, H, J, K et O constituent des sous-populations sources et les sous-populations C, E, F, Q des sous-populations puits. La situation de la sous-population M est par contre plus difficile à interpréter.

Du fait d'une dynamique d'extinction-recolonisation, toutes les sous-populations n'auront pas le même âge. Dans un tel système, on s'attend donc à ce que toutes les sous-populations n'aient pas atteint le même stade d'évolution. On s'attend également à ce que les pressions de sélection ne soient pas les mêmes dans toutes les sous-populations, conduisant à des évolutions différentes de leur composition génétique. Une telle dynamique a été décrite

notamment pour au moins deux autres modèles de conflit génomique (nucléo-cytoplasmique), la gynodioécie (Couvet *et al.*, 1998; McCauley *et al.*, 2000; Pannell, 1997) et l'incompatibilité cytoplasmique chez les insectes (Rousset *et al.*, 1991) pour expliquer la maintenance du polymorphisme des facteurs sexuels dans les populations. Si les recolonisations se font à partir d'un nombre limité de migrants, la sous-population nouvellement fondée aura une diversité génétique réduite. Sa composition initiale influencera sa future évolution et on peut alors s'attendre à ce que les différentes sous-populations évoluent de manière différente. Les simulations réalisées au Chapitre VI montrent que les fréquences initiales des facteurs féminisants et des facteurs de résistance leur correspondant peuvent fortement influencer l'équilibre final d'une population.

2. Origine récente de la métapopulation de la RBI de Chizé

Au sein de la RBI, les marqueurs microsatellites indiquent une structuration génétique très faible et non significative. Les tests de Mantel n'indiquent pas d'isolement par la distance. La diversité génétique nucléaire semble donc homogène entre les sous-populations analysées de la RBI de Chizé. Trois hypothèses non exclusives peuvent expliquer ces résultats : 1/ l'ensemble des sous-populations n'est pas encore arrivé à l'équilibre migration-dérive, 2/ les flux de gènes sont très importants entre les différentes plateformes, 3/ le jeu de données utilisé n'est pas suffisant pour détecter une structuration significative. La première hypothèse est parfaitement compatible avec l'historique de la RBI de Chizé, qui suggère que la présence d'*A. vulgare* dans la RBI date au maximum de 50 ans (tout au moins sur les plateformes). On peut raisonnablement rejeter la troisième hypothèse car l'utilisation des mêmes marqueurs sur les populations périphériques donnent des résultats significatifs pour des tailles d'échantillons à peine supérieures ($\overline{N} = 22$ pour les populations périphériques contre $\overline{N} = 15{,}1$ et $\overline{N} = 19{,}3$ respectivement pour les échantillons d'adultes et de juvéniles de la RBI). Les tests de goulots d'étranglement sont significatifs pour au moins un modèle de mutation (IAM) dans huit des neuf sous-populations analysées (échantillons d'adultes). Les résultats obtenus avec ces tests sur les échantillons de juvéniles vont dans le même sens, avec 4 tests significatifs et deux tests presque significatifs (Hp et Op1 ; $P = 0{,}078$) sur six échantillons. Ces tests suggèrent une fondation récente et/où des goulots d'étranglements récents sur ces populations. Aussi il est probable qu'elles n'ont pas atteint l'équilibre migration-dérive.

Contrairement aux marqueurs microsatellites, le marqueur mitochondrial et *Wolbachia* indiquent une forte structuration des sous-populations de la RBI. Cette structuration est comparable au cours des trois années d'échantillonnage. Elle ne peut être compatible que si

les mâles dispersent plus que les femelles ou si des phénomènes de sélection influencent la diversité génétique mitochondriale, par exemple par auto-stop génétique des facteurs féminisants *f* et *Wolbachia*. Dans les deux cas, la dynamique des fréquences mitochondriales et des prévalences de *Wolbachia* est peu influencée par celles des sous-populations voisines. Les sous-populations de la RBI de Chizé ne constituent donc pas une seule population étendue sur l'ensemble de la RBI de Chizé. L'hypothèse de forts flux de gènes entre les sous-populations ne semble donc pas expliquer la faible structuration observée sur les loci microsatellites. Les sous-populations de la RBI de Chizé forment donc un système récent de sous-populations dont les dynamiques sont au moins partiellement indépendantes.

3. Impact favorable d'une dynamique en métapopulation sur les prévalences de *Wolbachia* ?

Hatcher (1999 ; 2000) a montré que la structuration des populations avait un impact négatif sur les prévalences des facteurs féminisants car ceux-ci entrainent une raréfaction locale des mâles et fragilise par conséquent les populations (diminution du taux de croissance et augmentation du risque d'extinction de la population). Cependant, on peut remarquer que les études théoriques menées sur le modèle de la gynodioécie ont donné des résultats contradictoires, certains montrant qu'une structuration des populations favorisait les fortes prévalences de femelles (Couvet, 1998) et d'autres les défavorisait (Pannell, 1997). Les prévalences de *Wolbachia* sont étonnament élevées dans la RBI de Chizé lorsqu'on les compare aux prévalences dans les populations périphériques ou celles observées dans d'autres études (Chapitre IV ; Juchault *et al.*, 1993 ; Rigaud *et al.*, 1999). Une dynamique en métapopulation où les populations sont fortements connectées et présentent une dynamique d'extinction-recolonisation est peut-être favorable au maintien de prévalences élevées de *Wolbachia*.

Dans la RBI de Chizé, les sous-populations présentent une forte hétérogénéité dans les prévalences de *Wolbachia*. Les élevages réalisés à partir de femelles gravides montrent que les femelles infectées produisent plus de filles que les femelles non-infectées. Il semble également exister des différences entre femelles infectées par *w*VulM et par *w*VulC, les premières produisant davantage de portées biaisées en faveur des femelles. On peut donc s'attendre à une hétérogénéité au moins des sexe-ratios primaires et peut-être des sexe-ratios opérationnelles dans les populations. En l'absence de migrations, certaines sous-populations pourraient alors souffrir d'un déficit de mâles. Or des expériences menées en laboratoire (Caubet, pers. comm.) ont montré que les mâles explorent davantage leur environnement que

les femelles et disperseraient donc plus que les femelles. Les résultats obtenus dans le Chapitre VI semblent confirmer le fait que les mâles dispersent plus que les femelles. Les migrations plus importantes des mâles ont tendance à rééquilibrer les sexe-ratios des populations où les mâles sont rares et favorisent donc le maintien de ces populations. L'apport de migrants mâles ne peut se faire principalement qu'à partir des populations dont la sexe-ratio est moins biaisée ou équilibrée (c'est-à-dire peu infectées par *Wolbachia*). En effet, si toutes les populations présentent un excès de femelles, la dispersion des mâles n'aura pas d'effet sur les sexe-ratios des populations et elles seront toutes fragilisées par le déficit de mâles. La proximité de populations à sexe-ratio biaisée et de populations à sexe-ratio non-biaisée est donc indispensable à une telle dynamique. Les faibles migrations des femelles vont limiter l'homogénéisation des prévalences de *Wolbachia* parmi les sous-populations. La dynamique en métapopulation va également permettre le maintien d'une varation des prévalences dans les sous-populations par les extinctions-recolonisation (effet fondateur qui limite la diversité des femelles initialement présentes). Un tel fonctionnement peut permettre le maintien de fortes prévalences de *Wolbachia* au sein de la RBI.

4. Réseau d'îles périphériques ?

Les sept populations périphériques échantillonnées présentent des diversités génétiques comparables à celles des sous-populations de la RBI de Chizé. Elles présentent une structuration génétique nucléaire faible mais significative, compatible avec un modèle d'isolement par la distance. Ces résultats suggèrent que la structuration inter-population est proche de l'équilibre migration-dérive. Cependant, plusieurs populations périphériques présentent des traces d'un goulot d'étranglement récent (PA, PB, PE, PF et PG). La population PA se trouve sur un site de très petite taille, probablement régulièrement perturbé. La population PB se trouve sur un terrain où des arbres ont été plantés récemment et il n'est pas impossible que cette population ait été fondée après ou lors cette plantation. Malheureusement aucune donnée n'est disponible sur l'état de ce site avant cet aménagement. Les populations PC, PE, PF et PG ont été récoltées dans des prairies de fauche de plus ou moins grande taille, et la population PG dans un fossé pierreux en bordure d'une pâture à vaches. Il est difficile de trouver les causes des goulots d'étranglement détectés dans les populations PE, PF et PG. Ces populations semblent toutefois évoluer de façon différente des populations étudiées dans le chapitre IV. Les populations périphériques semblent ici faire partie d'un système métapopulationnel plus large dans lequel la métapopulation de la RBI de Chizé constituerait un ensemble comparable à un "continent" formé de nombreuses îles échangeant régulièrement

des migrants et les populations périphériques des îles plus isolées les unes des autres, autour de ce "continent".

La structuration observée sur le marqueur mitochondrial est presque trois fois supérieure entre les populations périphériques ($F_{ST} = 0{,}437$) qu'entre les sous-populations de la RBI de Chizé ($F_{ST} \sim 0{,}15$). Du fait de ses faibles prévalences dans les populations périphériques (excepté la population PD), *Wolbachia* y joue probablement un rôle limité sur la structuration de l'ADN mitochondrial. Deux études précédentes (Juchault *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999) ont montré que les populations hébergeants des femelles génétiques *ZW* et le facteur *f* représentent plus de la moitié des cas étudiés. Les populations hébergeants uniquement des femelles génétiques et celles hébergeant à la fois des femelles génétiques et *Wolbachia* sont rares. Etant donné qu'il est peu probable qu'une population soit uniquement composée de femelles génétiques, on peut raisonnablement penser que les populations périphériques hébergent au moins l'élément *f* et/ou des femelles génétiques *ZW*.

La constitution des populations périphériques semble donc différente de celles des sous-populations de la RBI de Chizé. L'existence d'un isolement par la distance sur l'ADN mitochondrial suggère que les évènements de sélection sur des facteurs féminisants ne permettent pas d'expliquer entièrement la structuration observée. La transmission partiellement paternelle de l'élément *f* peut rapidement briser le déséquilibre d'association avec un mitotype donné (Grandjean *et al.*, 1993; Rigaud & Juchault, 1993). Les simulations réalisées au Chapitre VI montrent que l'élément *f* induit un auto-stop génétique important sur l'ADN mitochondrial seulement si le gène masculinisant *M* est rare dans la population. Lorsque le gène masculinisant est plus fortement représenté dans la population dès le début de la simulation, l'élément *f* n'a qu'un effet très limité sur la diversité génétique mitochondriale. La situation semble ici intermédiaire. Un gène masculinisant joue probablement un rôle dans la dynamique du système. En effet, un mâle porteur de l'élément *f* et du gène masculinisant pourra transmettre l'élément *f* à sa descendance quelque soit le mitotype de la mère. Ceci brisera le déséquilibre d'association entre l'élément *f* et l'ADN mitochondrial. La structuration de l'ADN mitochondrial au sein des populations périphériques semble donc être la résultante entre d'une part des flux de gènes décroissants avec la distance et d'autre part un auto-stop génétique partiel de l'élément *f* sur l'ADN mitochondrial.

VI. Biais de structuration génétique lié au sexe : biais de dispersion lié au sexe ou effet des facteurs féminisants ?

A. Introduction

Chez de nombreuses espèces, il a été montré que mâles et femelles ne dispersent pas à la même fréquence. Notamment, les mâles dispersent plus que les femelles chez la plupart des espèces de mammifères. A contrario, la situation est inversée chez les oiseaux (Greenwood, 1980). De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer l'existence de tels biais de dispersion liés au sexe : compétition sexuelle (entre mâles pour l'accès aux femelles, entre femelles pour les sites de ponte, etc...), évitement de la consanguinité ou coût de la dispersion sur la fécondité (Dobson, 1982; Greenwood, 1980; Johnson, 1986; Part, 1995; Pusey, 1987; Wolff & Plissner, 1998; Zerra & Denno, 1997). Cependant, la compréhension des tendances évolutives des biais de dispersion liés au sexe restent un enjeu important en écologie.

Au cours des dernières années, l'étude des biais de dispersion liés au sexe a connu un intérêt croissant de la part des généticiens des populations. Les approches utilisées peuvent être classées en deux catégories : (i) celles comparant des marqueurs de classes différentes (par exemple transmis paternellement versus transmis maternellement) et (ii) celles utilisant des tests basés sur une seule classe de marqueur et comparant la structuration génétique observée chez les mâles à celle des femelles (voir Chapitre I). La comparaison de marqueurs de classes différentes, par exemple des marqueurs microsatellites nucléaires et un marqueur mitochondrial, est difficile car ils présentent des modes d'évolution différents (taux de mutation, taille effective, etc...). Une différence de structuration génétique importante entre ces deux types de marqueurs ne signifie donc pas forcément un biais de dispersion lié au sexe.

Des expériences éthologiques menées au laboratoire ont montré que les mâles et les femelles A. vulgare ont des comportements différents. En particulier, les femelles s'aggrègent plus que les mâles et explorent moins leur environnement (Y. Caubet, pers. comm.). On peut donc s'attendre à ce que les mâles dispersent plus que les femelles. Un tel biais de dispersion peut jouer un rôle important dans la dynamique de *Wolbachia* dans les populations naturelles. Notamment, une faible dispersion des femelles peut ralentir la propagation de *Wolbachia* à travers les populations alors que la plus forte dispersion des mâles peut au contraire favoriser la propagation de gènes de résistance ou de l'élément *f*. Dans l'optique de vérifier l'existence d'un biais de dispersion en faveur des mâles, des tests de biais de structuration entre les sexes ont été réalisés sur les données microsatellites puis sur les données du marqueur

mitochondrial. Cependant, les résultats obtenus présentant certaines incohérences, un effet des facteurs féminisants a rapidement été suspecté. Des simulations ont donc également été réalisées afin de tester l'hypothèse que les différences de structuration génétiques de l'ADN mitochondrial observées entre mâles et femelles sont dues à la présence de facteurs féminisants.

B. Matériels et méthodes

1. Données empiriques

Les analyses réalisées dans ce chapitre sont basées sur les données obtenues dans le Chapitre V (RBI de Chizé et sept populations périphériques).

Des tests de biais de structuration génétique lié au sexe ont été réalisés sur les données microsatellites (cinq loci) à l'aide du logiciel FSTAT (Goudet, 2001; Goudet *et al.*, 2002). F_{IS}, F_{ST}, apparentement *r*, moyenne *mAIc* et variance *vAIc* des indices d'assignement corrigés, hétérozygoties observées *Ho* et attendues *He* ont été comparées entre mâles et femelles par 5000 permutations. Cette analyse a été réalisée séparément (i) sur les échantillons d'adultes de la RBI de Chizé collectés en 2003 (10 sous-populations), (ii) sur les échantillons de juvéniles et (iii) sur les populations périphériques.

La présence d'un biais de structuration entre mâles et femelles sur l'ADN mitochondrial a été testée en comparant les F_{ST} entre mâles et femelles. A cette fin, trois approches ont été utilisées. Dans un premier temps, des tests sur permutation on été réalisés avec le logiciel FSTAT (Goudet, 2001; Goudet *et al.*, 2002) de la même façon que sur les loci microsatellites. Cette analyse a été réalisée séparément (i) sur les échantillons d'adultes de la RBI de Chizé collectés en 2004 (16 sous-populations), (ii) sur les échantillons de juvéniles et (iii) sur les populations périphériques. Dans un second temps, j'ai calculé les F_{ST} par paires d'échantillons séparément pour chaque sexe et je les ai comparés graphiquement en représentant la relation entre $F_{ST\ \text{mâle}}$ et $F_{ST\ \text{femelle}}$. Cette analyse a été réalisée sur les échantillons d'adultes de la RBI de Chizé de 2004 et sur les populations périphériques. Enfin, le biais de structuration a été comparé avec le logiciel FSTAT (Goudet, 2001; Goudet *et al.*, 2002) entre juvéniles et adultes (échantillons de 2004) des six populations où des juvéniles avaient été échantillonnés (B, H, J, O, Q et R).

2. Simulations

Afin d'analyser les effets éventuels de *Wolbachia* sur la structuration génétique de l'ADN mitochondrial, des simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel SEXDET version

4.02 (janvier 2007, Yves Caubet). Je me suis en particulier intéressé aux effets des facteurs féminisants sur les biais de structuration (F_{ST}) liés au sexe afin de proposer des hypothèses alternatives à un biais de dispersion lié au sexe pour expliquer le patron de structuration observé dans les populations naturelles. Une approche par simulation a été préférée à une approche analytique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le nombre d'éléments génétiques à prendre en compte est très élevé et rend les équations complexes, d'autant plus qu'il s'agit de comparer des paires de populations à des stades évolutifs différents à l'aide de *F*-statistiques. D'autres part, on ne s'intéresse pas à toutes les situations possibles, mais uniquement, celles qu'une population est susceptible d'atteindre au cours de son évolution étant donné sa composition initiale. Nous avons donc pris en compte l'évolution des populations au cours du temps pour définir l'évolution du biais de structuration lié au sexe en fonction de la dynamique des facteurs génétiques sexuels.

Si on considère un ensemble de populations, un facteur génétique sexuel tel que *Wolbachia* va contaminer les différentes populations par migration, mais il ne les infectera pas toutes au même instant *t*. A l'état initial, toutes les populations ont la même composition génétique (statut d'infection des femelles et un seul mitotype présent) et elles n'atteindront pas le nouvel équilibre stable au même moment. L'idée a donc été de simuler des populations à des stades variés d'invasion par des facteurs féminisants et des facteurs de résistance sans migration entre elles (excepté lors de l'introduction des facteurs dans les populations au temps $t = 0$ de la simulation). Les migrations entre populations sont absentes dans le modèle, car au mieux, elles diminuent la structuration et le biais de structuration éventuel en homogénéisant les populations. Le biais de structuration est alors plus difficile à détecter. Au pire, elles peuvent induire un biais de structuration entre mâles et femelles, au moins dans le cas d'un biais de dispersion entre les sexes. Dans ce dernier cas, le biais de dispersion lié au sexe peut soit amplifier le biais existant, soit l'annuler, voire l'inverser et il sera très difficile de séparer les effets des facteurs génétiques sexuels des effets du comportement de dispersion.

Le protocole suivi a donc été le suivant :

- En condition initiale, on considère une population de composition génétique stable (généralement une population composée pour moitié de femelles génétiques *ZW* avec un mitotype noté 1 et pour moitié de mâles *ZZ* avec un mitotype noté 1) dans laquelle on introduit (par migration) un ou plusieurs facteurs féminisants associés à un mitotype étranger (noté 2) et dans certaines simultions, un gène de résistance à une fréquence faible (par exemple 0,001). Seules les fréquences mitochondriales sont prises en compte et on suppose une absence de polymorphisme mitochondrial dans la population initiale.

- Simuler l'évolution de la population jusqu'à l'obtention de fréquences stables de tous les marqueurs génétiques du modèle, sans migration.
- L'évolution des fréquences des mitotypes dans la population au cours du temps est représentée graphiquement pour les mâles et pour les femelles.
- Chaque temps *t* de génération est considéré comme une population indépendante arrivée à un stade *t* d'évolution. Les F_{ST} par sexe pour chaque paire de générations sont ensuite calculés à l'aide d'Arlequin (en considérant des populations d'une taille arbitraire de 10000 individus car Arlequin nécessite une taille d'échantillon pour fonctionner et Sexdet considère une population de taille infinie).
- Finalement, les $\Delta_{F_{ST}} = F_{ST\ \text{Mâles}} - F_{ST\ \text{Femelles}}$ sont calculés pour chaque paire de populations et représentés graphiquement en fonction des stades t_1 et t_2 d'évolution des populations comparés.

Le logiciel SEXDET est un logiciel de simulation permettant de suivre l'évolution des fréquences des facteurs sexuels (chromosomes sexuels, *Wolbachia*, élément *f*, gènes de résistance) de manière déterministe (il n'inclue pas de stochasticité) au cours du temps à partir d'une population initiale dont la composition génétique est définie par l'utilisateur. Il suppose une taille de population infinie totalement isolée (pas de flux de gènes avec d'autres populations), des croisements aléatoires entre mâles et femelles et des générations non chevauchantes.

On peut introduire plusieurs lignées de *Wolbachia* et leur assigner des phénotypes différents (féminisation, male-killing, incompatibilité cytoplasmique) et des traits d'histoire de vie différents (taux de transmission, taux de féminisation). On peut également introduire jusqu'à trois versions différentes de *f* avec des caractéristiques différentes (moyenne et variance du taux de transmission, fréquence de conversion de *Wolbachia* en *f*, etc.). De la même façon, on peut spécifier différents gènes de résistance (masculinisants, curatifs ou de résistance à la transmission). Des marqueurs génétiques neutres nucléaires et mitochondriaux peuvent également être incorporés au modèle. Il est possible de paramétrer les relations de dominance et les modes de transmission de tous les facteurs génétiques et des marqueurs génétiques neutres.

Au total 9 cas de figures ont été simulés à l'aide du logiciel SEXDET. Ils sont présentés dans le Tableau VI-1.

Tableau VI-1 Résumé des simulations effectuées.

Situation testée	Femelles présentes initialement	Femelles introduites	Fréquence initiale de *r*	Fréquence initiale de *M*
Invasion d'une population saine par un facteur féminisant en l'absence de gène de résistance	Femelles génétiques	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,9)	0	0
	Femelles génétiques	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,7)	0	0
Remplacement d'une souche de *Wolbachia* par une autre	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,7)	Femelles à *Wolbachia* (t = 0,9)	0	0
Invasion d'une population saine par *f* en présence du gène masculinisant	Femelles génétiques	Femelles porteuses de *f* (t = 0,7)	0	0,0005
	Femelles génétiques	Femelles porteuses de *f* (t = 0,7)	0	0,1
Invasion d'une population saine par *Wolbachia* en présence du gène de résistance	Femelles génétiques	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,9)	0,0005	0
	Femelles génétiques	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,9)	0,1	0
	Femelles génétiques	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,9)	0,25	0
	Femelles génétiques	Femelles infectées par *Wolbachia* (t = 0,9)	0,5	0

C. Résultats

La structuration génétique a été comparée entre mâles et femelles à la fois sur les marqueurs microsatellites et sur le marqueur mitochondrial afin de tester la présence d'un biais de dispersion entre sexes et de tester l'existence d'effets éventuels des facteurs féminisants *Wolbachia* et *f* sur les structurations génétiques nucléaire et mitochondriale de l'hôte *A. vulgare*.

1. Loci microsatellites

Les tests de biais de structuration génétique ont été réalisés dans un premier temps avec le logiciel FSTAT (Goudet, 2001; Goudet *et al.*, 2002) sur les cinq loci microsatellites (Tableau VI-2). Au sein de la RBI de Chizé, les échantillons d'adultes ne montrent pas de biais significatif de structuration génétique lié au sexe, excepté *vAIc* qui est significativement plus élevé chez les femelles que chez les mâles ($P = 0,026$). Aucun des tests effectués sur les échantillons de juvéniles n'est significatif. Au sein des populations périphériques, trois estimateurs indiquent des biais de structuration génétique liés au sexe significatifs. Les F_{IS} sont significativement plus élevés chez les mâles que chez les femelles ($P = 0,002$) et *vAIc* est

significativement plus élevé chez les femelles que chez les mâles ($P = 0{,}029$). Si on interprête ces résultats comme le résultat d'un biais de dispersion, ils sont contradictoires car les F_{IS} vont dans le sens d'une dispersion plus forte des mâles que des femelles et les *vAIc* dans le sens d'une dispersion plus importante des femelles. Bien que ne présentant pas de différences significatives entre les sexes, les F_{ST} et l'apparentement r vont également dans le sens d'une dispersion plus importante des mâles (respectivement $P = 0{,}067$ et $P = 0{,}103$). Contre toute attente, *Ho* diffère également entre les sexes au sein des populations périphériques, les mâles présentant un hétérozygotie observée plus faible que celle des femelles ($P = 0{,}006$). Une telle différence n'est pas attendue dans le cas d'un biais de dispersion lié au sexe et suggère qu'un autre phénomène est à l'origine des biais de structuration observés. Un tel phénomène pourrait expliquer les résultats contradictoires obtenus avec les autres estimateurs. La combinaison des échantillons de la RBI de Chizé et des populations périphériques donnent des résultats en tout point similaires, excepté que *mAIc* est significativement plus élevé chez les mâles que chez les femelles ($P = 0{,}05$).

Tableau VI-2 Tests de biais de structuration génétique effectués entre les sexes dans la RBI de Chizé (adultes et juvéniles) et les populations périphériques. Cases gris foncées : biais de structuration correspondant à une dispersion plus importante des mâles que des femelles. Cases gris clairs : biais de structuration correspondant à une dispersion plus importante des femelles que des mâles. Les valeurs significatives sont notées en gras. P(♂<♀) = proportion de permutations ayant donné des indices de structuration plus biaisés que celui observé, dans le sens où l'indice des mâles est supérieur à celui des femelles.

		F_{IS}	F_{ST}	*r*	*mAIc*	*vAIc*	*Ho*	*He*
Adultes RBI Chizé	♂	0,012	0,024	0,045	-0,092	**2,203**	0,746	0,755
	♀	0,024	0,026	0,049	0,072	**3,110**	0,743	0,762
	P(♂<♀)	0,438	0,202	0,209	0,261	**0,026**	0,507	0,609
	P(♂>♀)	0,565	0,790	0,782	0,737	0,971	0,481	0,373
Populations périph.	♂	**0,107**	0,039	0,068	-0,258	**2,739**	**0,694**	0,778
	♀	**0,000**	0,018	0,036	0,227	**4,354**	**0,768**	0,768
	P(♂<♀)	0,996	0,936	0,895	0,051	**0,029**	**0,006**	0,777
	P(♂>♀)	**0,002**	0,067	0,103	0,943	0,971	0,993	0,216
Adultes RBI Chizé et populations périph.	♂	**0,065**	0,031	0,057	**-0,183**	**2,535**	**0,718**	0,768
	♀	**0,011**	0,022	0,043	**0,152**	**3,702**	**0,756**	0,765
	P(♂<♀)	0,990	0,784	0,729	**0,050**	**0,007**	**0,028**	0,806
	P(♂>♀)	**0,011**	0,219	0,277	0,954	0,993	0,969	0,190
Juvéniles RBI Chizé	♂	0,063	0,014	0,025	0,238	4,780	0,707	0,754
	♀	0,027	0,009	0,016	-0,140	3,492	0,752	0,773
	P(♂<♀)	0,794	0,567	0,552	0,822	0,885	0,118	0,158
	P(♂>♀)	0,204	0,436	0,448	0,183	0,117	0,889	0,848

Tableau VI-3 Hétérozygoties attendues et observées et F_{IS} des mâles et des femelles de la RBI de Chizé et des populations périphériques. * hautement significatif.

	He		*Ho*		F_{IS}	
	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles
C	0,72	0,76	0,64	0,73	0,123	0,046
E	0,70	0,71	0,60	0,77	0,200	-0,102
F	0,71	0,77	0,80	0,82	-0,154	-0,066
G	0,77	0,79	0,76	0,75	0,011	0,053
H	0,75	0,78	0,89	0,61	**-0,196**	**0,225**
J	0,77	-	0,82	-	-0,061	-
K	0,77	0,76	0,65	0,83	**0,161**	-0,106
M	0,80	0,70	0,86	0,68	-0,083	0,035
O	0,79	0,83	0,71	0,80	0,108	0,036
Q	0,74	0,63	0,65	0,67	0,114	-0,081
Ensemble des échantillons d'adultes de la RBI de Chizé					0,013	0,012
Bp	0,74	0,72	0,69	0,73	0,064	-0,017
Hp	0,79	0,69	0,78	0,73	0,018	-0,073
Jp	0,76	0,75	0,81	0,69	-0,071	0,083
Op1	0,78	0,74	0,72	0,60	0,081	**0,205**
Op2	0,79	0,78	0,75	0,57	0,054	**0,296**
Qp	0,78	0,78	0,74	0,88	0,048	-0,134
Ensemble des échantillons de juvéniles de la RBI de Chizé					0,027	0,063
PA	0,77	0,78	0,89	0,68	-0,159	**0,129**
PB	0,74	0,80	0,67	0,72	0,095	0,108
PC	0,79	0,77	0,85	0,65	-0,080	**0,152**
PD	0,80	0,77	0,71	0,76	0,115	0,014
PE	0,77	0,77	0,76	0,73	0,016	0,056
PF	0,77	0,74	0,76	0,70	0,008	0,055
PG	0,75	0,78	0,78	0,62	-0,053	**0,210**
Ensemble des populations périphériques					0,000	**0,107 ***

Pour apporter plus d'éléments à l'analyse des biais d'hétérozygotie observée et de F_{IS} entre sexes, j'ai analysé les hétérozygoties par (sous-) population et par sexe parmi les 23 échantillons disponibles (populations périphériques et RBI de Chizé). L'hétérozygotie attendue est comparable entre mâles et femelles dans tous les échantillons analysés (Tableau VI-3). Par contre l'hétérozygotie observée peut présenter des différences importantes allant jusque 28% d'hétérozygotes. Par exemple, l'échantillon H présente une hétérozygotie obeservée de 0,89 chez les femelles et de seulement 0,61 chez les mâles. Les F_{IS} sont significatifs au seuil de 5% dans six échantillons chez les mâles (H, Op1, Op2, PA, PC et PG) et dans deux échantillons chez les femelles (H et K), mais aucune valeur n'est significative après correction de Bonferroni ($k = 45$). Il faut remarquer que les mâles et les femelles d'une même population présentent parfois des valeurs F_{IS} très différentes. C'est le cas par exemple de la population H où les femelles présentent un excès d'hétérozygotes (F_{IS} = -0,196) et les mâles un déficit en hétérozygotes (F_{IS} = 0,225).

2. Locus mitochondrial

Les tests sur permutation (Tableau VI-4) indiquent une structuration génétique significativement plus importante pour les femelles que pour les mâles dans les échantillons d'adultes de la RBI de Chizé ($F_{ST\ \text{mâle}} = 0{,}094$ et $F_{ST\ \text{femelle}} = 0{,}225$; $P = 0{,}01$) et lorsqu'on combine les échantillons d'adultes de la RBI avec les populations périphériques ($F_{ST\ \text{mâle}} = 0{,}203$ et $F_{ST\ \text{femelle}} = 0{,}347$; $P = 0{,}003$). Ces tests n'indiquent par contre pas de biais de structuration significatif dans les échantillons de juvéniles (ce qui est attendu s'ils ont été échantillonnés avant dispersion) et dans les populations périphériques, bien que dans ce dernier cas, la valeur F_{ST} est plus élevée chez les femelles que chez les mâles.

Tableau VI-4 Test sur F_{ST} de biais de structuration génétique lié au sexe effectué sur le marqueur mitochondrial (*COX2*) à l'aide du logiciel FSTAT (10 000 permutations).

F_{ST}	♂	♀	$P(F_{ST\ ♂} < F_{ST\ ♀})$
RBI de Chizé (adultes)	**0,094**	**0,225**	**0,010**
RBI de Chizé (juvéniles)	0,302	0,328	0,316
RBI de Chizé (adultes) et populations périphériques	**0,203**	**0,347**	**0,003**
Populations périphériques	0,382	0,506	0,156

Parmi les échantillons de 2004 de la RBI de Chizé (Tableau A-5 en Annexe IV), peu de valeurs F_{ST} par paires de populations calculés pour chaque sexe sont significatives, aussi bien chez les mâles que chez les femelles (respectivement 2 sur 120 et 26 sur 120). Les valeurs F_{ST} sont plus élevées lorsqu'elles sont calculées sur les échantillons de femelles (min. -0,078 ; max. 0,764 ; moyenne 0,194) que sur les échantillons de mâles (min. -0,168 ; max. 0,618 ; moyenne 0,085). Entre populations périphériques, la structuration observée va également dans le sens d'une structuration plus forte sur les échantillons de femelles, bien que la différence soit moins marquée. 10 comparaisons sur 21 sont significatives parmi les échantillons de mâles et 13 sur 21 chez les femelles. Les valeurs F_{ST} ont également tendance a être plus importantes chez les femelles (min. -0,033 ; max. 0,811 ; moyenne 0,443) que chez les mâles (min. -0,036 ; max. 0,712 ; moyenne 0,353).

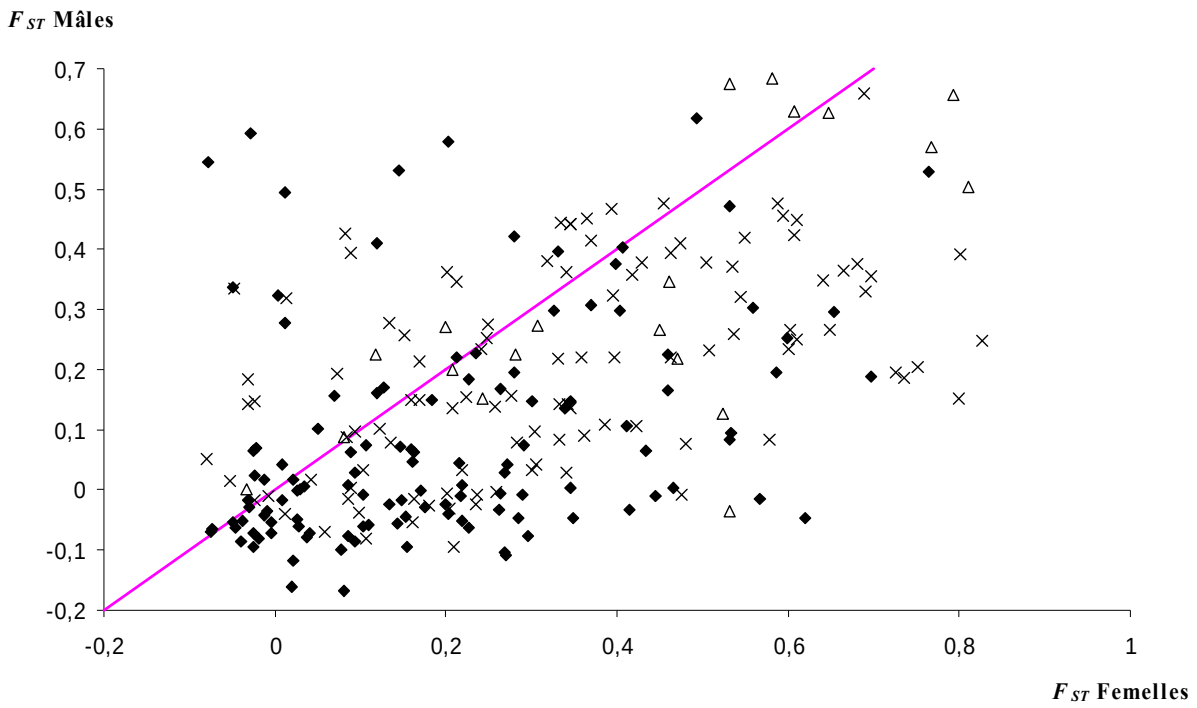


Figure VI-1 Comparaisons des valeurs F_{ST} du Tableau A-5 en Annexe IV, calculées séparément par sexe. La diagonale correspond à l'égalité $F_{ST\ \text{Mâles}}=F_{ST\ \text{Femelles}}$. Les losanges noirs correspondent aux comparaisons entre sous-populations de la RBI, les triangles blancs aux comparaisons entre populations périphériques et les croix aux comparaisons entre sous-populations de la RBI et les populations périphériques.

La représentation des F_{ST} calculés sur les mâles en fonction de ceux calculés sur les femelles (Figure VI-1) montre un nombre nettement plus important de points situés en dessous de la diagonale $F_{ST\ \text{mâles}} = F_{ST\ \text{femelles}}$. 59 points sur 253 sont situés au dessus de la diagonale et indiquent une valeur F_{ST} supérieure pour les femelles. En l'absence de biais de structuration, on devrait observer autant de points au dessus qu'en dessous de la diagonale.

Les F_{ST} calculés par paire de populations et par sexe sur les échantillons de juvéniles collectés dans la RBI de Chizé (Tableau A-6 en Annexe IV) indiquent également un biais de structuration génétique entre mâles et femelles. En effet, les valeurs F_{ST} sont globalement plus importantes pour les femelles (min. -0,077 ; max. 0,649 ; moyenne 0,270) que pour les mâles (min. -0,243 ; max. 0,632 ; moyenne 0,182). La présence de ce biais chez les juvéniles suggère l'intervention d'un facteur autre qu'un biais de dispersion lié au sexe ou que les juvéniles avaient déjà commencé à disperser lorsqu'ils ont été échantillonnés.

La comparaison des juvéniles et des adultes échantillonnés dans les six sous-populations B, H, J, O, Q et R indique une structuration stable chez les femelles [$F_{ST\ \text{juvéniles}} = 0{,}306$; $F_{ST\ \text{adultes}} = 0{,}295$; $P(F_{ST\ \text{adultes}} < F_{ST\ \text{juvéniles}}) = 0{,}539$] et une structuration plus faible chez les mâles adultes que chez les mâles juvéniles [$F_{ST\ \text{juvéniles}} = 0{,}315$;

$F_{ST\ \text{adultes}} = 0{,}204$; $P(F_{ST\ \text{adultes}} < F_{ST\ \text{juvéniles}} = 0{,}365)$]. Ces résultats, bien que non significatifs suggèrent une dispersion plus importante des mâles que des femelles. En effet, si les mâles dispersent plus que les femelles, la structuration génétique observée sur les mâles diminuera plus vite au cours de leur vie que celle observée sur les femelles.

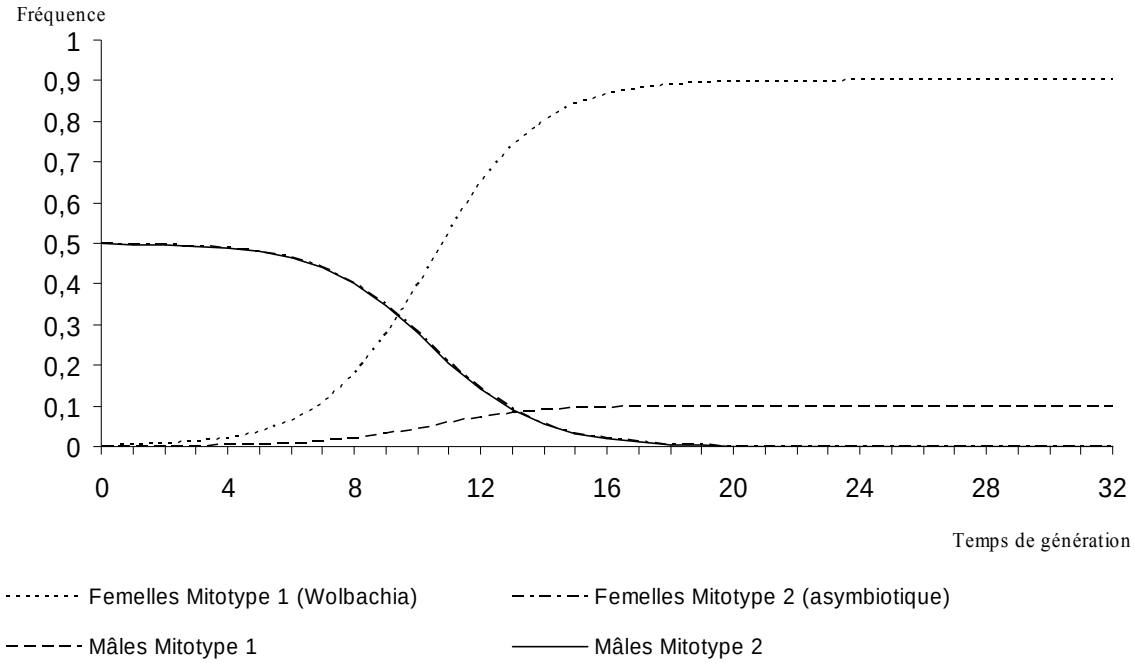
3. Simulations

a) Simulations en l'absence de gène de résistance

Les deux premiers cas de figure simulés concernent l'invasion d'une population composée pour moitié de femelles génétiques (WZ) et pour moitié de mâles (*ZZ*) par une souche de *Wolbachia* en l'absence de gènes de résistance. Afin de mesurer l'effet du taux de transmission de la bactérie, j'ai réalisé la première simulation avec un taux de transmission de 90% et la seconde avec un taux de transmission de 70%. Les résultats des simulations sont identiques d'un point de vue qualitatif mais diffèrent quantitativement. Le point d'équilibre est atteint plus rapidement lorsque *Wolbachia* présente un taux de transmission élevé (respectivement 32 et 54 générations pour des taux de transmission de 90% et 70%). Etant donné que *f* se comporte grosso modo comme *Wolbachia* en l'absence de gène masculinisant (excepté le taux de transmission dont la moyenne est plus faible et la variance est plus élevée mais n'a pas d'effet ici), ces simulations peuvent être extrapolées au cas de l'invasion de *f* dans une population saine.

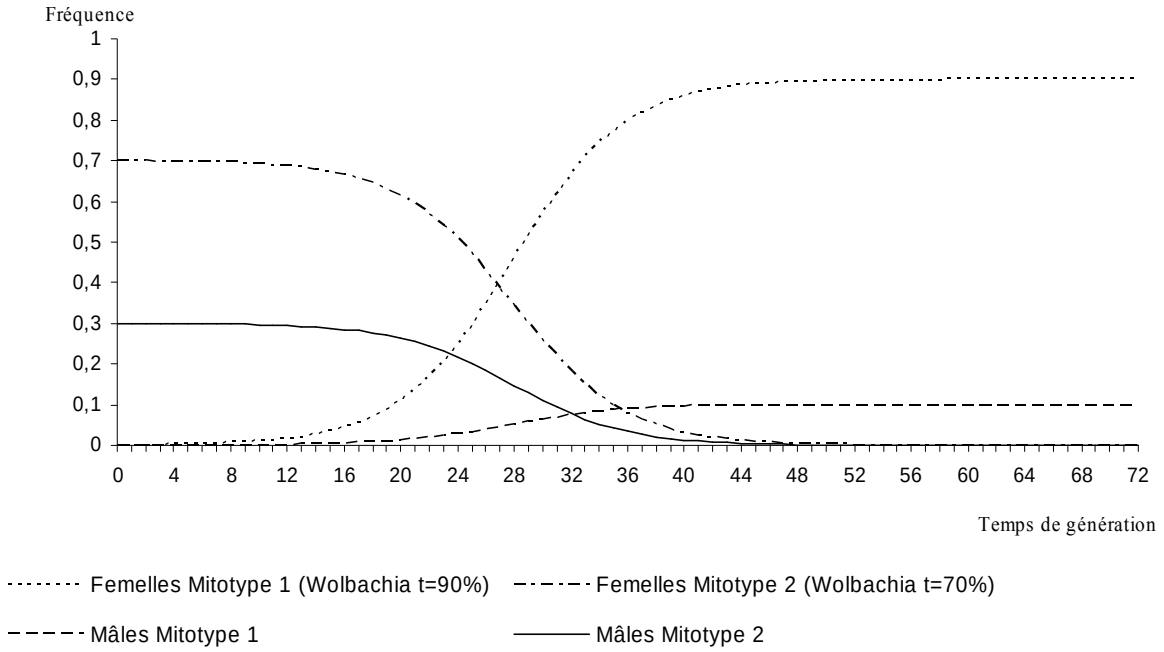
Dans les deux cas simulés, à l'équilibre, *Wolbachia* atteint une prévalence égale à son taux de transmission et les femelles génétiques disparaissent totalement de la population (Figure VI-2). Leur disparition entraîne inévitablement la disparition du mitotype 2, aussi bien chez les femelles que chez les mâles et du chromosome *W*. Le mitotype 2 est remplacé par le mitotype 1 associé à *Wolbachia*. Le processus est plus rapide pour la bactérie qui possède le taux de transmission le plus élevé. On peut noter qu'à chaque temps de génération, les fréquences des femelles et des mâles qui possèdent le mitotype 2 (non associé à *Wolbachia*) sont égales et déclinent à la même vitesse. Par contre la fréquence des mâles qui possèdent le mitotype 1 augmente moins vite que celle des femelles à *Wolbachia* (mitotype 1).

Figure VI-2 Evolution de la composition génétique (types sexuels et fréquences mitochondriales) au cours de l'invasion d'une population asymbiotique (population composée initialement de 50% de femelles génétiques *ZW* et de 50% de mâles *ZZ*, mitotype 2) par une souche de *Wolbachia* (taux de transmission = 0,9 ; mitotype 1).



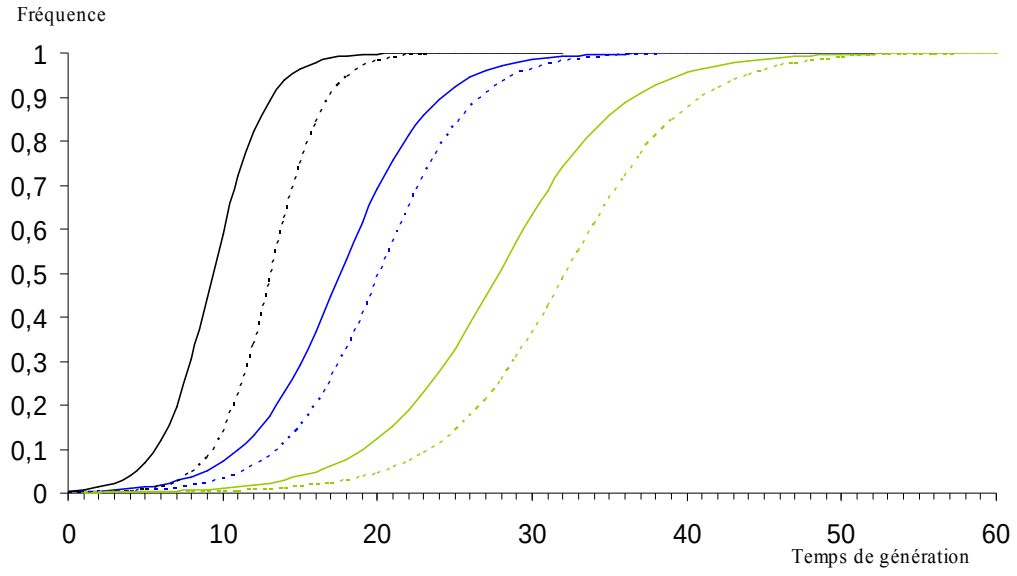
Le troisième cas de figure simulé (Figure VI-3) concerne le remplacement d'une souche de *Wolbachia* peu compétitive (taux de transmission = 70%) par une souche plus compétitive (taux de transmission = 90%). Les résultats sont en tous points comparables à ceux des deux simulations précédentes. Cependant le point d'équilibre est atteint plus tardivement et la sexe-ratio est biaisée dès le départ (70% de femelles) et augmente jusque la valeur de 90%. On peut également noter que la proportion de mâles ayant le mitotype 2 (associé à la souche de *Wolbachia* résidente) décroit plus vite que celle des femelles ayant le même mitotype, dans la population. Par contre, la fréquence des femelles ayant le mitotype 1 (associé à la souche de *Wolbachia* plus compétitive et envahissante) augmente plus vite que celle des mâles ayant le même mitotype.

Figure VI-3 Evolution de la composition génétique (types sexuels et fréquences mitochondriales) au cours de l'invasion d'une population infectée par une souche de *Wolbachia* peu compétitive (taux de transmission de 70 %, population initialement composée de 70% de femelles infectées et 30% de mâles ; mitotype 2) par une souche de *Wolbachia* plus compétitive (taux de transmission = 0,9 ; mitotype 1).



Les fréquences mitochondriales évoluent différemment chez les mâles et chez les femelles (Figure VI-4). Dans les trois cas de figure, la fréquence du mitotype associé à la souche de *Wolbachia* envahissante augmente plus vite chez les femelles que chez les mâles. Cela entraîne une différence de composition génétique importante entre les mâles et les femelles d'une même population. Cette différence est plus importante lorsque le taux de transmission de *Wolbachia* est plus élevé et pour des prévalences intermédiaires de *Wolbachia*. Le maximum observé est de 50 points entre mâles ($p_{\text{mitotype 1}}$ = 0,22) et femelles ($p_{\text{mitotype 1}}$ = 0,72) à la génération 11 (prévalence de *Wolbachia* = 0,53) lors de l'invasion d'une population saine par une souche de *Wolbachia* dont le taux de transmission est de 90%. Une différence supérieure à 1 point entre mâles et femelles est observée sur une durée de 19 générations dans le premier modèle, 27 générations dans le 2e et 40 générations dans le 3e. La différence de composition génétique entre mâles et femelles est donc présente sur un plus grand nombre de générations mais plus faible lorsque le taux de transmission de *Wolbachia* est plus faible et lors du remplacement d'une souche de *Wolbachia* par une autre.

Figure VI-4 Evolution de la fréquence du mitotype associé à *Wolbachia* chez les mâles (pointillés) et les femelles (trait continu) au cours de l'invasion de *Wolbachia* (bleu : taux de transmission = 0,7 ; noir, taux de transmission = 0,9) dans une population comprenant initialement uniquement des femelles génétiques et de l'invasion d'une souche de *Wolbachia* à taux de transmission élevé (90%) dans une population initialement infestée d'une souche de *Wolbachia* à faible taux de transmission (70%, courbes vertes).



La représentation graphique des ΔF_{ST} calculés à partir des résultats d'analyses du logiciel Arlequin montre que selon le stade d'évolution des populations-générations comparées, on peut avoir une structuration génétique biaisée entre les sexes dans un sens ou dans l'autre (Figure VI-5). On observe une structuration plus importante pour les femelles que pour les mâles lorsqu'on compare des populations/générations présentant une faible prévalence de *Wolbachia* (inférieure à 30% de la population, ce qui correspond aux 10 premières générations) avec une population infectée à un niveau intermédiaire (de 4 à 88% de la population c'est-à-dire les générations 5 à 17) mais le biais est d'autant plus important que la prévalence de cette deuxième population-génération est proche de 50%, c'est-à-dire les générations 11-12). Le biais maximal est observé entre la génération 0 et la génération 11 avec un ΔF_{ST} = -0,49 ($F_{ST\ Mâles}$ = 0,22 ; $F_{ST\ Femelles}$ = 0,71). Inversement, on observe une structuration génétique plus forte pour les mâles que pour les femelles lorsqu'on compare des populations/générations présentant une forte prévalence de *Wolbachia* (supérieure à 75% de la population, ce qui correspond aux générations 17 et suivantes) avec une population infectée à un niveau intermédiaire (de 4 à 88% de la population c'est-à-dire les générations 5 à 17). Ici également, le biais est maximal lorsque la prévalence de cette deuxième population-génération est proche de 50%, c'est-à-dire les générations 11-12). Le biais maximal est observé entre la génération 32 et la génération 11 avec un ΔF_{ST} = 0,49 ($F_{ST\ Mâles}$ = 0,78 ; $F_{ST\ Femelles}$ = 0,28).

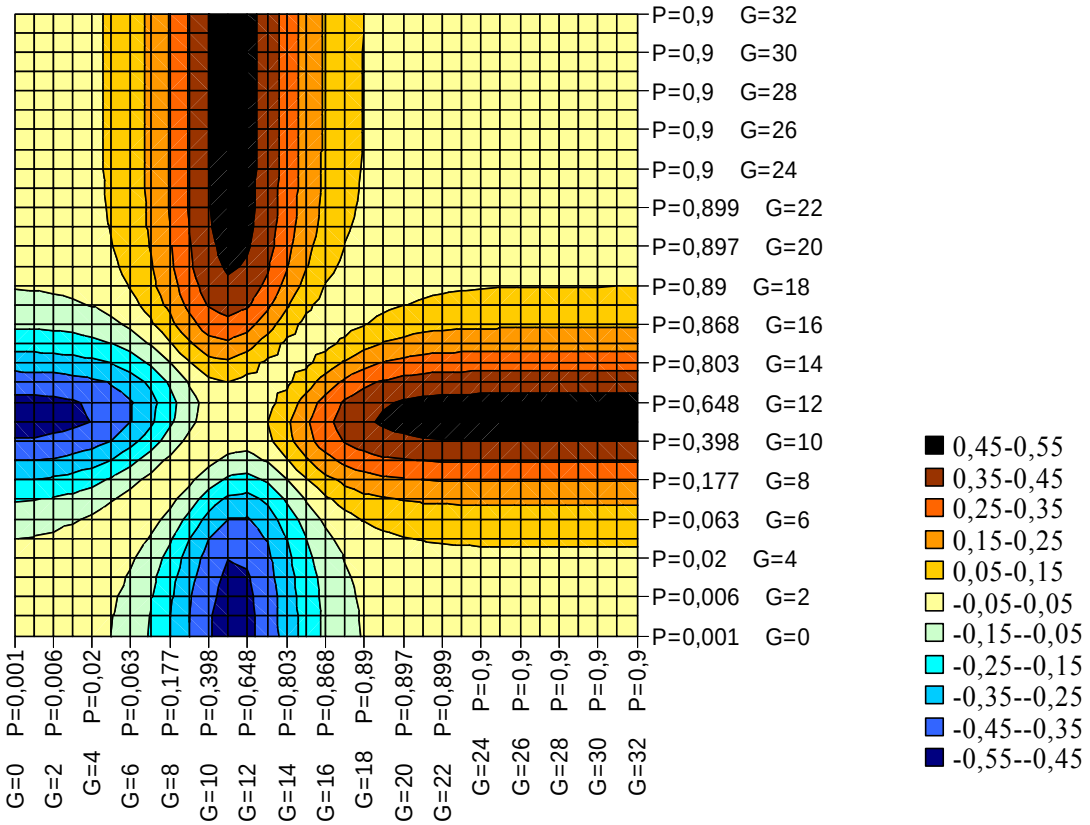


Figure VI-5 ΔF_{ST} par paire de générations consécutifs à l'introduction d'une souche de *Wolbachia* féminisante dont le taux de transmission est de 90% dans une population composée initialement de femelles génétiques *ZW* (50%) et de mâles *ZZ* (50%). En abscisse et en ordonnée sont indiqués les temps de génération (G = 0 à 32) et la prévalence de *Wolbachia*.

Les résultats obtenus dans les deux autres modèles présentés sur la Figure VI-4, donnent des résultats comparables d'un point de vue qualitatif. Cependant l'intensité des biais de structuration est systématiquement plus faible que dans le modèle avec une *Wolbachia* dont le taux de transmission de 90% et les biais de structuration sont présents entre un plus grand nombre de générations. Une souche de *Wolbachia* ayant un faible taux de transmission et envahissant une population saine induira donc des biais de structuration génétique entre mâles et femelles plus faibles ($\Delta F_{ST\,Min}$ = -0,21 et $\Delta F_{ST\,Max}$ = 0,21 dans le 2e modèle et $\Delta F_{ST\,Min}$ = -0,32 et $\Delta F_{ST\,Max}$ = 0,32 dans le 3e modèle) mais plus tardivement et sur une durée plus importante. Il en sera de même lors du remplacement d'une souche de *Wolbachia* peu compétitive par une autre souche plus compétitive.

b) Simulations avec un facteur féminisant en présence d'un gène de résistance

La propagation de *Wolbachia* dans une population peut être limitée par la présence d'un gène de résistance à la transmission de celle-ci (Rigaud & Juchault, 1992; Rigaud *et al.*, 1999). L'effet féminisant de *f* peut être annulé par un gène nucléaire masculinisant. Le

déséquilibre d'association entre *f* et l'ADN mitochondrial est rompu en présence de ce dernier. On peut dès lors se demander quels sont les effets de ces gènes sur le biais de structuration de l'ADN mitochondrial. Plusieurs simulations ont donc été réalisées afin de tester l'hypothèse que ces gènes peuvent empêcher l'apparition ou au moins limiter l'importance d'un biais de structuration de l'ADN mitochondrial entre les mâles et les femelles. Les deux cas correspondant à l'invasion de *Wolbachia* en présence d'un gène nucléaire de résistance à la transmission et l'invasion de *f* dans une population en présence d'un gène nucléaire masculinisant, ont été simulés avec des paramètres initiaux différents.

- ***f* et le gène masculinisant "*M*"**

L'invasion de *f* en présence du gène masculinisant a été simulée dans deux cas de figures. Dans les deux cas *f* est introduit (en association avec un mitotype 1) à une fréquence de 0,001 dans une population composée pour moitié de femelles génétiques *ZW* (mitotype 2) et de mâles *ZZ* (mitotype 2). La fréquence initiale du gène masculinisant est de 0,0005 lors de la première simulation et de 0,1 lors de la seconde.

Lors de la première simulation (Figure VI-6), l'évolution du système peut être décomposée en deux phases. Dans un premier temps (générations 1 à 22), *f* augmente rapidement en fréquence jusqu'à la valeur $p = 0{,}49$ et entraîne avec lui le mitotype 1 par autostop génétique. Ce dernier augmente plus rapidement en fréquence que *f* ($p = 0{,}69$ à la génération 22) car l'ADN mitochondrial est transmis à tous les descendants, mais *f* n'est transmis qu'à 70% des descendants. Comme en l'absence de gène masculinisant, le chromosome *W* diminue rapidement en fréquence. Le gène masculinisant n'est pas sélectionné dans cette phase car la sexe-ratio n'est pas très biaisée. Sa fréquence augmente lentement lors de cette première phase (de 0,0005 à 0,0006).

A la fin de cette première phase, la sexe-ratio est biaisée avec seulement 36% de mâles. Dans la deuxième phase, le gène masculinisant va rapidement augmenter en fréquence jusqu'à une valeur finale de 0,20 car il présente un avantage dans une population présentant un excès de femelles. Au début de cette phase, la sexe-ratio continue à diminuer lentement jusqu'à une valeur minimum de 0,33 car le gène masculinisant est peu fréquent au début et *f* est beaucoup plus abondant et continue sa propagation. Lorsque le gène masculinisant atteint une fréquence seuil de 0,01, il va inverser l'évolution de la sexe-ratio qui va progressivement se rééquilibrer avec l'augmentation de fréquence du gène masculinisant. L'augmentation de fréquence du gène masculinisant va également permettre la présence de *f* chez un nombre de mâles de plus en plus important, qui pourront le transmettre à leur descendance. La conséquence est que *f* va continuer à augmenter en fréquence au-delà de 0,7 (son taux de

transmission) pour atteindre 0,844. Il est intéressant de noter que le chromosome *W* tout comme le mitotype 2 ne disparaissent pas entièrement de la population et subsistent tous deux à une fréquence de 4,3% à l'équilibre.

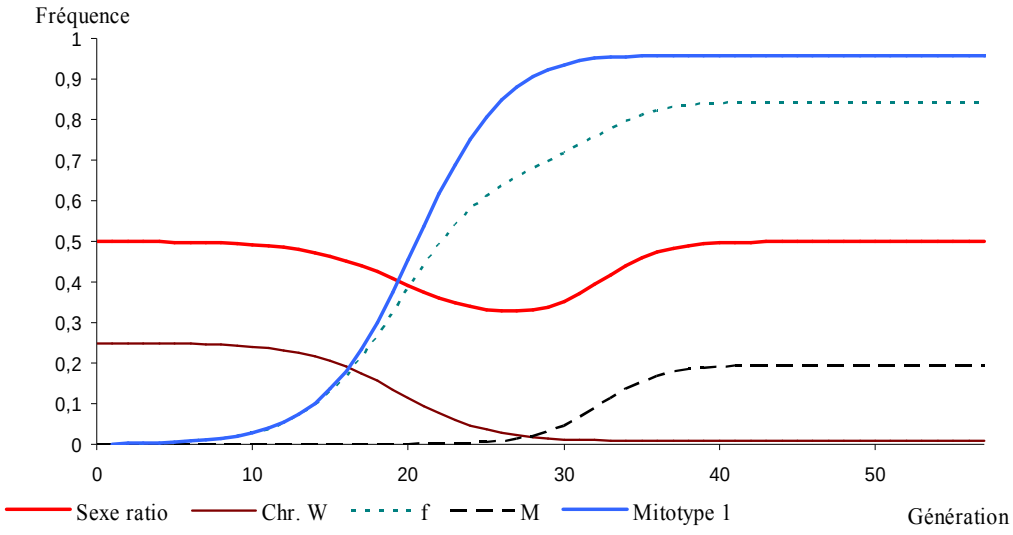


Figure VI-6 Introduction de *f* (associé au mitotype 1) dans une population de femelles génétiques et de mâles en présence d'un gène masculinisant (*p* = 0,001)

L'évolution du système est sensiblement différente lors de la deuxième simulation (Figure VI-7). En effet, dans une première étape, lorsque *f* est rare, le chromosome *W* va être sélectionné et le gène masculinisant contre-sélectionné car la sexe-ratio initiale n'est pas équilibrée (60 % de mâles). Parallèlement, *f* va envahir la population et induire progressivement une sexe-ratio légèrement biaisée en faveur des femelles. Son effet sur la sexe-ratio est limité par la présence du gène masculinisant à une fréquence non négligeable. Au cours de son invasion, *f* va provoquer une diminution de la fréquence de *W* jusqu'à une valeur de 0,2 mais il ne provoque pas sa disparition. En biaisant la sexe-ratio, l'augmentation de fréquence de *f* va provoquer celle du gène masculinisant qui à l'équilibre atteint la fréquence de 0,22, pour une fréquence finale de f égale à 0,83 et une sexe-ratio de 0,5. Cependant, le plus intéressant est que très rapidement, le gène masculinisant brise le déséquilibre d'association entre le mitotype 1 et *f*, ce qui a pour résultat que le mitotype 1 n'augmente pas aussi vite en fréquence que *f* et n'atteint qu'une fréquence de 0,11 dans la population à l'équilibre. *f* a donc un effet limité sur les fréquences mitochondriales lorsqu'un gène masculinisant est suffisamment fréquent dans la population.

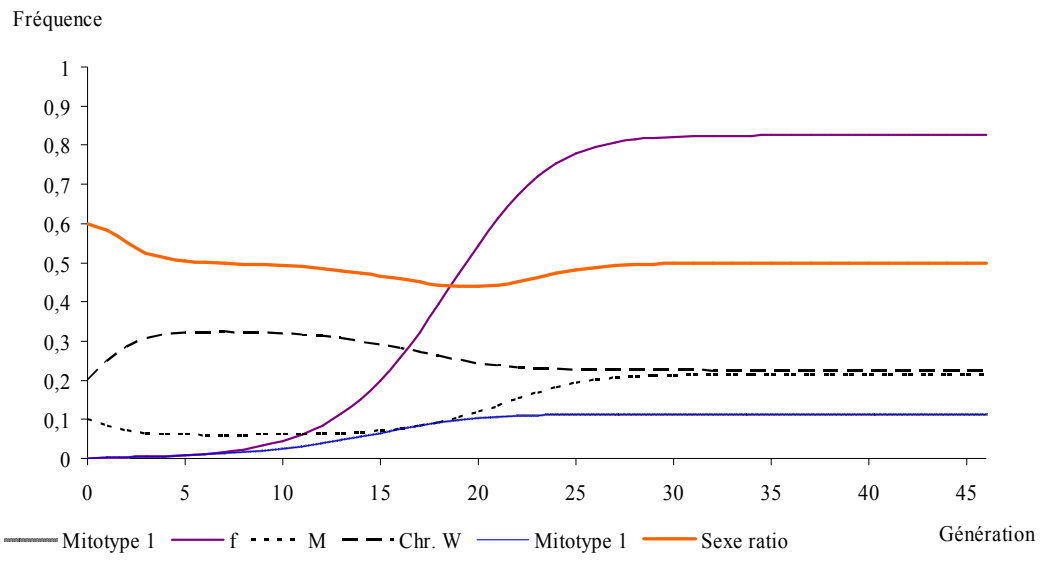


Figure VI-7 Introduction de *f* (associé au mitotype 1) dans une population de femelles génétiques et de mâles en présence d'un gène masculinisant (p = 0,1)

L'analyse de l'évolution du mitotype initialement associé à *f* chez les mâles et chez les femelles indique un biais de composition génétique important dans le cas de la première simulation (Figure VI-8). Ce biais est tout à fait comparable en intensité et en durée au biais observé lors des simulations en l'absence de gène masculinisant. Pour cette raison, les valeurs F_{ST} par paires de populations/générations ne sont pas représentées. Dans le cas de la deuxième simulation, la fréquence du mitotype 1 est toujours très proche chez les mâles et chez les femelles (maximum 2 points d'écart à la génération 15). Le biais de composition génétique induit ici est donc négligeable et n'aura qu'un impact très limité sur les valeurs F_{ST} par paires de populations-générations.

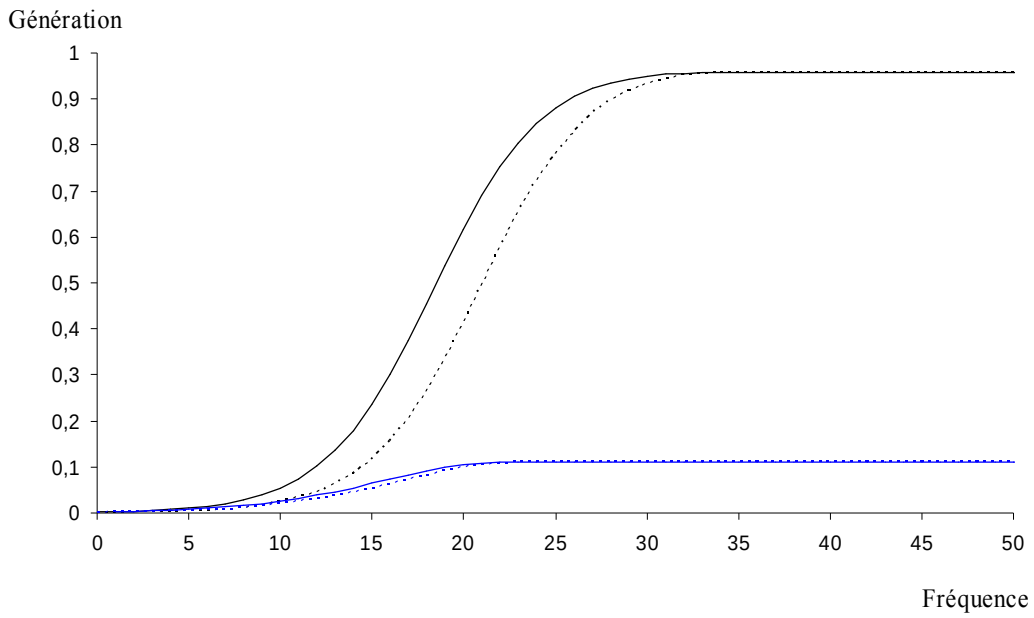


Figure VI-8 Evolution de la fréquence du mitotype initialement associé à *f* chez les mâles (pointillés) et chez les femelles (trait continu) lors de l'invasion de *f* dans une population contenant initialement un gène masculinisant à une fréquence de 0,0005 (courbes noires) et de 0,1 (courbes bleues).

- ***Wolbachia* et un gène de résistance à la transmission**

L'invasion de *Wolbachia* dans une population comprenant initialement moitié de femelles génétiques WZ (mitotype 2) et moitié de mâles *ZZ* (mitotype 2) a été simulée en présence d'un gène de résistance à la transmission. Quatre simulations ont été réalisées avec des fréquences initiales du gène de résistance à la transmission différentes (0,0005 ; 0,1 ; 0,25 et 0,5) pour analyser l'effet de ce gène sur le biais de structuration lié au sexe engendré par *Wolbachia* sur l'ADN mitochondrial. Dans les trois simulations, l'évolution des fréquences génétiques suivent une dynamique similaire, mais les résultats diffèrent quantitativement en fonction de la fréquence initiale du gène de résistance (Figure VI-9).

Lorsque la fréquence initiale du gène de résistance est de 0,0005, *Wolbachia* envahit rapidement la population (1ère phase) et entraîne par auto-stop génétique le mitotype 1. Elle atteint une fréquence maximum de 0,88 à la 19e génération (en l'absence de gène de résistance, elle atteint une fréquence de 0,89 à la même génération). Le mitotype 1 augmente en fréquence un peu plus vite que *Wolbachia* car l'ADN mitochondrial est transmis à tous les descendants et *Wolbachia* à 90% des descendants. Le mitotype 1 va quasiment se fixer au cours de cette première phase et atteindre une fréquence de 0,99 à la 19e génération. La progression de *Wolbachia* n'est quasiment pas affectée par le gène de résistance car il est rare dans la population et n'est pas fortement sélectionné lors des premières générations, c'est à

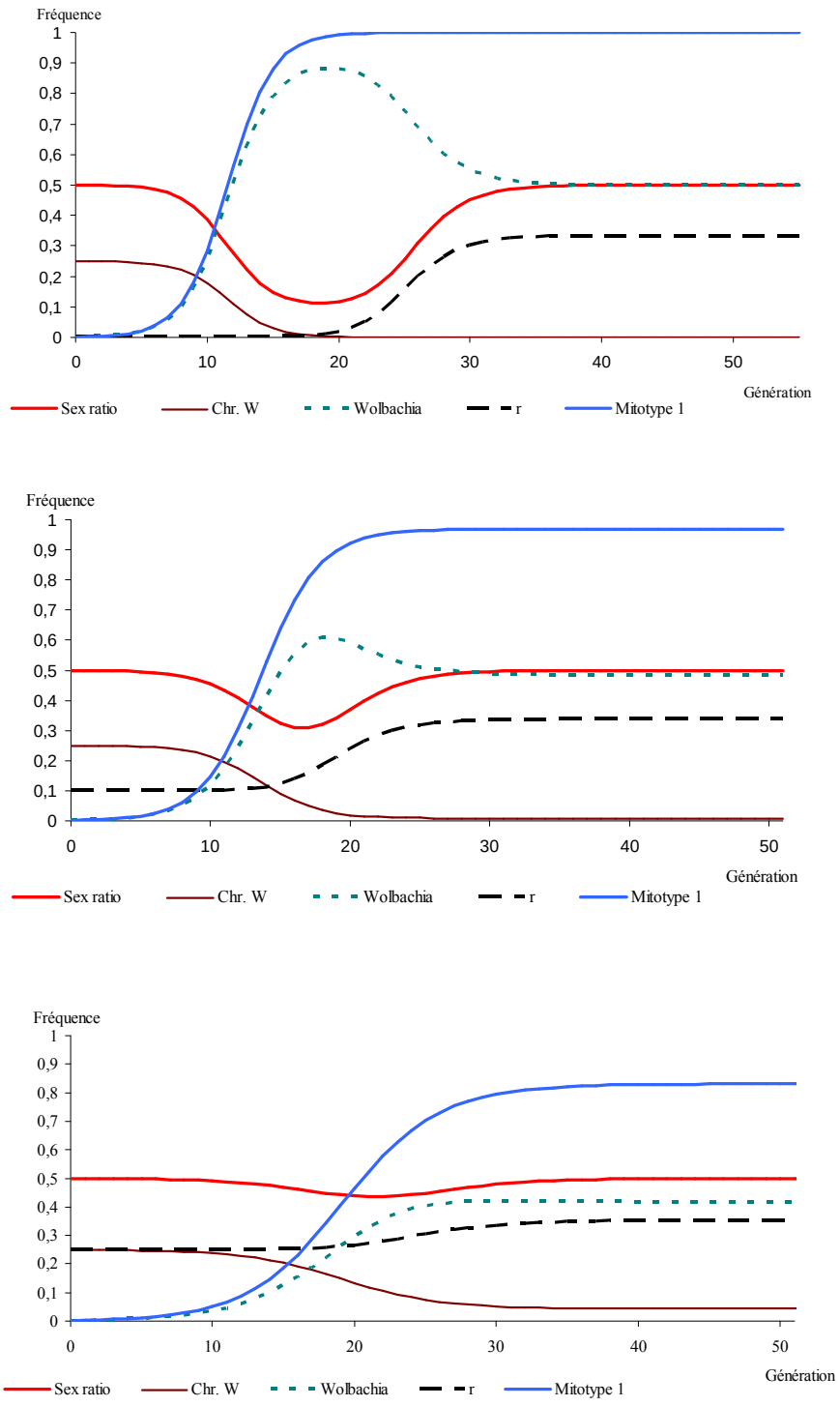


Figure VI-9 Introduction de *Wolbachia* (associée au mitotype 1) dans une population de femelles génétiques *ZW* et de mâles *ZZ* (mitotype 2) en présence d'un gène de résistance à la transmission à partir de trois fréquences initiales, du haut vers le bas : p = 0,0005 ; p = 0,1 ; p = 0,25

dire tant que la sexe-ratio est faiblement biaisée. L'augmentation de fréquence du gène de résistance est d'autant plus forte que la sexe-ratio est biaisée en faveur des femelles et elle n'est importante qu'à partir de la 19e génération lorsque le biais de sexe-ratio est le plus fort (89% de femelles). L'augmentation de fréquence du gène de résistance à la transmission va provoquer l'entrée dans une seconde phase qui correspond à la diminution de la fréquence de *Wolbachia* jusqu'à 0,5 à l'équilibre. La fréquence du gène de résistance à la transmission va également se stabiliser progressivement à la fréquence d'équilibre 0,33 et rétablir une sexe-ratio équilibrée (50% de mâles). Le mitotype 1 va encore augmenter un peu en fréquence, mais il ne va pas se fixer (le mitotype 2 est maintenu à une fréquence de 0,0001 ; Figure VI-10).

Dans le cas où le gène de résistance à la transmission a une fréquence initiale de 0,5, *Wolbachia* ne réussit pas à envahir la population et sa fréquence ne dépasse pas 0,1%. Elle n'aura donc qu'un effet très marginal sur la diversité génétique de l'ADN mitochondrial de la population et les résultats ne sont pas présentés en détail.

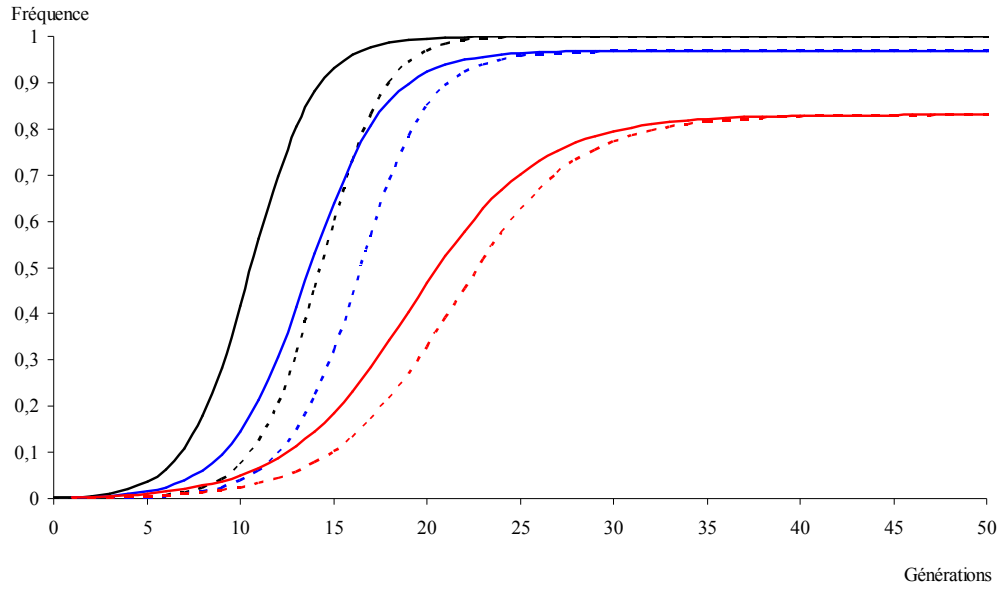


Figure VI-10 Evolution de la fréquence du mitotype initialement associé à *Wolbachia* chez les mâles (pointillés) et chez les femelles (trait continu) lors de l'invasion de *Wolbachia* dans une population contenant initialement un gène masculinisant à une fréquence de 0,0005 (courbes noires), 0,1 (courbes bleues) et 0,25 (courbes rouges).

Dans les deux autres simulations, la dynamique est en tout point comparable à celle de la 1ère simulation (Figuare VI-9). Cependant, lorsqu'on augmente la fréquence initiale du gène de résistance à la transmission, ce dernier limite et ralentit la progression de *Wolbachia* (prévalences maximum de 0,61 et 0,42 respectivement pour des fréquences initiales du gène de résistance de 0,1 et 0,25). Le biais de sexe-ratio induit sera également réduit (minimum

31% et 44% de mâles respectivement). Plus la fréquence initiale du gène de résistance est élevée, plus la fréquence finale du mitotype 2 est élevée (fréquences respectives de 0,03 et 0,17 ; Figure VI-10). Il n'y a donc pas disparition totale du polymorphisme mitochondrial dans ces cas là. On peut aussi remarquer que plus la fréquence initiale du gène de résistance est élevée, plus l'équilibre est atteint tardivement. Le chromosome *W* se maintient également à une fréquence très faible (fréquences respectives de 0,008 et 0,04).

D. Discussion

1. Biais de structuration des marqueurs nucléaires

Les tests de biais de structuration réalisés sur la RBI de Chizé et les populations périphériques ont été appliqués afin de détecter un éventuel biais de dispersion lié au sexe et déterminer quel sexe disperse le plus. Cependant, les tests utilisés (F_{ST}, F_{IS}, *r*, *mAIc*, *vAIc*, *He*, *Ho*) indiquent des résultats variables selon l'échelle considérée et surtout contradictoires. En effet, Seule la variance des indices d'assignement *vAIc* indiquent une différence significative entre mâles et femelles, suggérant que les femelles dispersent plus que les mâles. Parmi les juvéniles, aucune différence significative n'est observée. Un tel résultat peut s'expliquer par le fait que les juvéniles ont été échantillonnés avant qu'ils ne dispersent. Cependant, la faible taille du jeu de données peut également être à l'origine d'une faible puissance statistique. Si on considère les populations périphériques, la situation devient beaucoup plus complexe. En effet, les F_{IS} sont significativement plus élevés chez les mâles (F_{IS} = 0,107) que chez les femelles (F_{IS} = 0). Les moyennes des indices d'assignement sont presque significativement différentes chez les femelles (*mAIc* = 0,227) et chez les mâles (*mAIc* = -0,258). Ces deux estimateurs indiqueraient plutôt un biais de dispersion en faveur des mâles. La variance des indices d'assignement *vAIc* est plus importante chez les femelles que chez les mâles, ce qui indiquerait au contraire une dispersion plus importante des femelles. Les valeurs F_{ST} sont également plus importantes chez les mâles que chez les femelles et suggèreraient également un biais de dispersion en faveur des femelles, mais la différence n'est pas significative. Ces résultats contradictoires suggèrent qu'un facteur autre que le comportement de dispersion est à l'origine de ce patron de structuration. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'hétérozygotie observée diffère significativement entre mâles et femelles, ce qui n'est pas attendu dans le cas d'un biais de dispersion lié au sexe.

Mécanisme populationnel

Bien que des analyses par simulations sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse je propose qu'il s'agit d'un effet de la présence des facteurs féminisants *f* et *Wolbachia*,

conjuguée aux effets d'un comportement de dispersion plus important des mâles que des femelles. Supposons, par exemple, une population composée de femelles génétiques *ZZ* et de femelles infectées par *Wolbachia*. Les femelles génétiques *ZZ* vont donner naissance à autant de mâles que de femelles. Les femelles infectées par *Wolbachia* vont au contraire produire beaucoup plus de femelles que de mâles. Par conséquent, les femelles à *Wolbachia* contribueront peu à la population mâle de la génération suivante, mais les deux types de femelles contribueront à la population femelle de la génération suivante. Les femelles issues de femelles génétiques auront donc plus de chance de s'accoupler avec un mâle apparenté (un frère par exemple) qu'une femelle issue d'une femelle infectée par *Wolbachia*, puisque les mâles qui lui sont apparentés (par exemple ses frères) seront beaucoup moins nombreux dans la population. Par conséquent, on peut s'attendre à un taux de consanguinité plus important dans les portées issues de femelles génétiques (croisements essentiellement entre apparentés) que dans celles issues de femelles infectées par *Wolbachia* (croisements essentiellement entre non-apparentés).

- **Diversité génique *He***

On peut s'attendre à ce que la diversité génique *He* soit plus importante chez les femelles que chez les mâles parce que la majorité des échanges génétiques se font depuis les individus issus de femelles génétiques vers les individus issus de femelles infectées par *Wolbachia*, via les mâles. Cependant, comme les femelles infectées par *Wolbachia* produisent aussi des mâles (mais en faible quantité) il existe aussi des flux de gènes dans l'autre sens. Les différences de diversité génique peuvent donc être faibles. Les données n'indiquent ici aucune différence significative entre mâles et femelles.

- **Hétérozygotie observée *Ho* et F_{IS}**

Du fait des croisements entre apparentés plus fréquents, l'hétérozygotie observée *Ho* sera plus faible chez les mâles et les femelles génétiques que chez les femelles infectées par *Wolbachia*. Si on considère toutes les femelles ensemble, *Ho* sera toujours plus faible que chez les mâles, mais les différences seront atténuées à cause du mélange d'individus consanguins et non-consanguins. A diversité génique égale, une valeur de *Ho* plus faible donnera une valeur F_{IS} plus élevée. Si les mâles dispersent plus, on s'attend également à des valeurs F_{IS} plus élevées chez ces derniers que chez les femelles. Les mâles auront donc des valeurs F_{IS} positives supérieures aux femelles. Parallèlement, les croisements entre femelles infectées par *Wolbachia* et mâles non apparentés vont induire un excès d'hétérozygotie et par conséquent des valeurs F_{IS} négatives chez celles-ci, ce qui accroitra encore plus les différences de F_{IS} entre mâles et femelles.

- **Apparentement *r* et F_{ST}**

Les mâles sont essentiellement issus d'une partie seulement des femelles de la génération précédente, alors que les femelles peuvent être issues de toutes les femelles de la génération précédente. Par conséquent, l'apparentement *r* des mâles doit être en moyenne plus important que l'apparentement des femelles. Ce phénomène sera amplifié par la proportion plus importante de croisements consanguins ayant donnés des mâles. Les données semblent correspondre à cette prédiction ($r_{\text{mâles}} = 0{,}068$; $r_{\text{femelles}} = 0{,}036$; différence non significative).

- Si la majorité des mâles est issue d'un nombre limité de femelles, la dérive génétique sera plus importante sur ces individus et les indices de structuration génétique tels que F_{ST} doivent donc être plus élevés que pour les femelles qui sont issues de toutes les femelles de la population. Les données semblent correspondre avec cette prédiction, puisque les F_{ST} sont plus importants chez les mâles ($F_{ST} = 0{,}039$) que chez les femelles ($F_{ST} = 0{,}018$; $P(F_{ST♂} > F_{ST♀} = 0{,}067)$.

- **Moyenne et variance des indices d'assignements**

L'explication des différences de *mAIc* et de *vAIc* sont plus difficiles à prédire. Les *AIc* sont des indices d'assignement basés sur les fréquences alléliques dans la population considérée. Plus un allèle est fréquent dans la population, plus un individu qui possède cet allèle aura une valeur d'*AIc* élevée. Un individu homozygote pour un allèle rare aura une valeur d'*AIc* très faible, alors qu'un individu homozygote pour un allèle fréquent dans la population aura au contraire une valeur d'*AIc* élevée. Chez les hétérozygotes, les combinaisons entre allèles rares et allèles fréquents donneront des valeurs intermédiaires. La courbe de distribution des valeurs d'*AIc* des individus homozygotes sera donc plus aplatie que celle des individus hétérozygotes qui aura plus la forme d'une cloche. On peut s'attendre à une plus forte variance des *AIc* pour les individus homozygotes que pour les hétérozygotes. Comme les mâles sont en moyenne plus souvent homozygotes que les femelles, on peut s'attendre à une plus grande variance des *AIc* pour ceux-ci. Il ne semble pas y avoir de raisons que la moyenne des indices d'assignements soit différente entre les mâles et les femelles. Une valeur positive des femelles et une valeur négative des mâles est compatible avec l'hypothèse que les mâles dispersent plus que les femelles.

2. Biais de structuration de l'ADN mitochondrial : effets conjoints d'un biais de dispersion et des facteurs féminisants

Les données génétiques obtenues au sein de la RBI de Chizé indiquent un biais de structuration génétique lié au sexe. Sur l'échantillonnage réalisé en 2004, les F_{ST} calculés sur

les mâles (F_{ST} = 0,094) sont significativement inférieurs à ceux calculés sur les femelles (F_{ST} = 0,225). Un tel biais de structuration génétique lié au sexe peut être expliqué par le fait que les mâles dispersent plus que les femelles. Une hypothèse alternative pourrait être un effet des facteurs féminisants *f* et *Wolbachia*. L'hypothèse que les mâles dispersent plus est appuyée par la comparaison de la structuration entre juvéniles et adultes dans la RBI de Chizé. En effet, la structuration génétique observée sur les femelles ne semble pas dépendre de leur âge. Par contre, la structuration génétique observée sur les mâles diminue (de manière non significative) entre les juvéniles ($F_{ST\ \text{juvéniles}}$ = 0,315) et les adultes ($F_{ST\ \text{adultes}}$ = 0,204). Une telle variation ne peut à priori s'expliquer que par un comportement de dispersion plus important des mâles que des femelles.

On peut remarquer sur la Figure VI-1, qu'un certain nombre de comparaisons indiquent des F_{ST} nettement plus important pour les mâles que pour les femelles, difficilement compatibles avec un biais de dispersion lié au sexe. Les deux cas les plus extrêmes étant des F_{ST} proches de 0,6 pour les mâles et des F_{ST} légèrement négatifs (donc nuls) pour les femelles. D'autres comparaisons de (sous-)populations présentent un biais exactement inverse avec des F_{ST} légèrement négatifs (donc nuls) pour les mâles et des F_{ST} proches de 0,6 pour les femelles. Un biais du comportement de dispersion permet probablement d'expliquer une partie des variations observées entre les structurations mâle et femelle, mais la prise en compte d'un autre facteur est nécessaire pour comprendre ce patron de structuration complexe.

Les simulations réalisées pour tester l'effet des facteurs féminisants sur la structuration de l'ADN mitochondrial ont montré que *Wolbachia* induit un biais de structuration génétique lié au sexe qui peut aller aussi bien dans la direction d'une structuration plus forte sur les mâles que sur les femelles que dans la direction opposée. L'élément *f* peut avoir le même effet à condition que le gène masculinisant *M* soit rare dans la population. Lors des simulations, les biais de structuration indiquaient des ΔF_{ST} atteignant en valeur absolue 0,5, ce qui est proche des différences maximales observées dans la RBI de Chizé (maxi. 0,63 ; mini. -0,66). L'intervention de ces deux facteurs peut donc permettre d'expliquer les comparaisons pour lesquelles les mâles présentent une structuration plus forte que les femelles. *Wolbachia* et peut-être *f*, dont on ne connaît pas la prévalence dans la RBI de Chizé induisent donc des biais de structuration dans les deux sens et un comportement de dispersion biaisé en faveur des mâles déplaceraient l'ensemble des points de la Figure VI-1 vers le bas, c'est-à-dire une structuration des femelles plus forte que celle des mâles.

VII. Conclusion et perspectives

Les deux objectifs principaux de ce travail étaient de comprendre l'impact des *Wolbachia* féminisantes sur la structuration de leur hôte *A. vulgare* et d'appréhender la dynamique des prévalences de *Wolbachia* dans les populations naturelles d'*A. vulgare*.

Avant mon travail de thèse, les prévalences et le polymorphisme des *Wolbachia* féminisantes étaient mal connus chez *A. vulgare*. En effet, les marqueurs utilisés dans les précédentes études ne permettaient pas de discriminer les différentes souches (voir par exemple Rigaud *et al.*, 1999). L'utilisation de gène *wsp* par Cordaux et al. (2004) a permis de mettre en évidence l'existence de deux souches de *Wolbachia* (*w*VulM et *w*VulC) chez *A. vulgare*. Contrairement aux études précédentes, *Wolbachia* a été trouvée dans la majorité des populations, quoiqu'à des prévalences très faibles. L'analyse du gène *wsp* a montré la coexistence de plusieurs souches dans la plupart des populations analysées dont *w*VulP, nouvelle souche décrite dans cette étude, qui présente la particularité d'être issue de la recombinaison des souches *w*VulM et *w*VulC. Le phénotype de cette souche n'est pas connu, mais est probablement féminisant. Cette découverte confirme l'existence de transferts horizontaux entre individus. Cependant, ces transferts restent rares et ne sont pas suffisants pour briser le déséquilibre de liaison observé entre l'ADN mitochondrial et *Wolbachia* à une échelle géographique réduite. Cordaux *et al.* (2004) ont toutefois montré qu'à une échelle géographique très large (Europe, Afrique du Nord, Amérique du Nord et du Sud), *w*VulC peut être associé aux quatre lignées mitochondriales d'*A. vulgare* et *w*VulM à deux d'entre elles. L'analyse de la répartition des associations mitotype-*Wolbachia* pourrait apporter des informations sur la fréquence des transferts horizontaux et la vitesse de propagation de *Wolbachia* à travers les populations d'*A. vulgare*.

La mise au point récente de marqueurs microsatellites chez *A. vulgare* a ouvert de nouvelles voies dans l'analyse de la structuration génétique et du fonctionnement des populations naturelles d'*A. vulgare*. Ils ont montré des niveaux de polymorphisme élevés et relativement homogènes dans toutes les populations analysées, quelques soient les prévalences de *Wolbachia*. Le polymorphisme observé dans la métapopulation récemment fondée de la RBI de Chizé est en tout point comparable à celui observé dans les autres populations. La structuration génétique nucléaire observée à une échelle régionale est relativement faible et compatible avec un modèle d'isolement par la distance, suggérant des flux de gènes importants.

La structuration observée sur l'ADN mitochondrial diffère fortement de la structuration génétique observée sur les marqueurs nucléaires de l'hôte et a permis de confirmer les résultats des études précédemment publiées (Grandjean *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999), à savoir que la structuration génétique de l'ADN mitochondrial est fortement liée à la dynamique d'invasion de *Wolbachia*, mais pas ou peu par l'élément *f*. Il avait été montré que, contrairement à *Wolbachia*, l'élément *f* posséde une transmission partiellement paternelle en présence du gène masculinisant '*M*' (Juchault *et al.*, 1992), et ne se trouve donc pas en déséquilibre d'association avec l'ADN mitochondrial (Grandjean *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1999). L'analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondrial d'*A. vulgare* a permis d'apporter des informations sur la dynamique des prévalences de *Wolbachia*. Les tests de neutralité effectués montrent en effet que le polymorphisme de l'ADN mitochondrial n'est pas compatible avec un modèle d'évolution neutre. Deux hypothèses ont été proposées et testées pour expliquer le polymorphisme observé : un fonctionnement en métapopulation des populations d'*A. vulgare* ou une évolution fréquence dépendante des facteurs féminisants avec un auto-stop génétique sur l'ADN mitochondrial. La comparaison avec les marqueurs nucléaires a alors été nécessaire. A une échelle régionale, les tests de goulots d'étranglement suggèrent que la plupart des populations d'*A. vulgare* sont pérennes. L'hypothèse d'une dynamique d'extinction-recolonisation ne permet donc pas d'expliquer les fortes variations des prévalences de *Wolbachia* et le polymorphisme mitochondrial observé. L'hypothèse proposée initialement pas Juchault *et al.* (1993) d'une évolution cyclique des fréquences des déterminants génétiques du sexe dans les populations d'*A. vulgare* semblent donc se confirmer. Cependant les conditions précises permettant une telle évolution ne sont pas encore clarifiées.

La comparaison des indices de structuration calculés séparément sur les mâles et sur les femelles a aussi mis en évidence un effet plus subtil des facteurs féminisants sur la structuration et la diversité génétique des populations. Des simulations ont montré que lors de l'augmentation en fréquence d'un facteur féminisant tel que *Wolbachia*, le nombre de femelles infectées augmente plus vite que le nombre de mâles issus de femelles infectées (et donc partageant le même mitotype). On observe alors une composition génétique mitochondriale légèrement différente entre mâles et femelles de la même population. Cela se traduit aussi par des indices de structuration différents en fonction des sexes lorsqu'on compare des populations présentant des prévalences différentes des facteurs féminisants. Le biais de structuration observé peut alors être très élevé et le sens de ce biais dépend du stade d'évolution des populations comparées.

Les effets observés des facteurs féminisants sur la structuration génétique d'*A. vulgare* ne s'arrêtent cependant pas là. Des tests de biais de structuration lié au sexe, initialement conçus pour tester des biais de dispersion entre mâles et femelles, ont été appliqués pour identifier le sexe qui disperse le plus chez *A. vulgare*. Les résultats obtenus étaient contradictoires. L'hypothèse retenue est que les facteurs féminisants sont responsables du patron de structuration observé. En effet, dans une population où femelles génétiques et facteurs féminisants cohabitent, les mâles sont principalement issus des femelles génétiques. La fille d'une femelle génétique aurait alors plus de chances de se reproduire avec un mâle apparenté que la fille d'une femelle porteuse d'un facteur féminisant. Par conséquent la consanguinité sera plus importante chez les mâles et les femelles génétiques que chez les autres femelles. Un tel mécanisme avait été décrit dans le cas de facteurs induisant la mort des mâles et étaient inattendus dans le cas des facteurs féminisants (Telshow, 2006 ; Engelstadter, 2007). Si l'hypothèse est bonne, cela signifie que les facteurs féminisants *Wolbachia* et *f* peuvent affecter le polymorphisme nucléaire et les les capacités d'adaptation des populations naturelles. L'absence de marqueur génétique de l'élément *f* complique cependant l'étude de ce phénomène chez *A. vulgare* et des recherches complémentaires sont indispensables.

Les perspectives de ce travail de thèse peuvent être résumées en sept points :

- **Traits d'histoire de vie des différentes souches de *Wolbachia***

L'analyse et la comparaison des traits d'histoire de vie des trois souches/variants de *Wolbachia* connus chez *A. vulgare* peuvent également apporter des informations importantes sur la dynamique de ces facteurs dans les populations naturelles. En particulier, la confirmation du phénotype féminisant de *w*VulP paraît indispensable. Dans le cadre de sa thèse, Marion Lachat a commencé à analyser les traits d'histoire de vie des souches *w*VulC et *w*VulM. Il faut cependant remarquer que des simulations ont montré que la coexistence de *Wolbachia* ayant des capacités d'invasion très inégales est possible sur le long terme en présence de gènes de résistance si ces gènes présentent un coût à la résistance et sont chacun spécifiques d'une souche donnée (au moins trois souches peuvent coexister ; données non publiées). Si les coûts sont suffisamment élevés, on peut également observer des oscillations très importantes, rapides et stables au cours du temps, des fréquences des différentes souches de *Wolbachia*. La prise en compte des traits d'histoire de vie dans les modèles théoriques paraît indispensable à la bonne compréhension du système.

- **Dynamique des populations et qualité du milieu**

L'analyse fine de l'impact de la qualité de l'habitat sur la dynamique locale des populations d'*A. vulgare* paraît indispensable à la bonne compréhension du fonctionnement de la

métapopulation de la RBI de Chizé. La création de nouveaux habitats et leur suivi permettraient d'appréhender la dynamique de colonisation d'*A. vulgare* de zones d'habitats vierges et également d'apporter des informations sur la dynamique de *Wolbachia* dans les populations nouvellement fondées.

- **Effet des facteurs féminisants sur la stabilité des populations d'*A. vulgare***

Une sex-ratio biaisée due à une forte prévalence de facteurs féminisants, peut fragiliser la dynamique de la population à cause d'un nombre trop restreint de mâles pour féconder les femelles (Hatcher *et al.*, 1999; Hatcher, 2000; Hatcher *et al.*, 2000; Rigaud & Moreau, 2004). Des simulations et la création de populations artificielles pourraient confirmer ou infirmer cette hypothèse. Par exemple, on pourrait comparer la dynamique de populations fortement infectées par *Wolbachia* et/ou l'élément *f* et de populations non-infectées sur plusieurs années. L'introduction de mâles étrangers dans les populations infectées dont la sexe-ratio est biaisée peut se traduire par une augmentation du taux de croissance selon l'influence que peut avoir *Wolbachia* sur les traits d'histoire d'*A. vulgare*.

- **Sélection sexuelle des mâles**

L'analyse du nombre de paternités observées par portées pourrait également apporter des informations sur leur rôle dans la régulation des prévalences de *Wolbachia*. Notamment, si les mâles s'accouplent plus fréquemment avec les femelles non-infectées dans la nature, on peut s'attendre à deux effets opposés. Dans le cas où les femelles infectées ont du mal à trouver des mâles consentants, le nombre de multipaternités par portées devrait être plus faible que chez les femelles non-infectées.

- **Biais de structuration génétique lié au sexe et distorteurs de sexe-ratio**

La comparaison des structurations génétiques observées sur des marqueurs génétiques nucléaires chez les mâles et chez les femelles sont souvent utilisées pour appréhender des biais de dispersion liés au sexe. Ce type d'analyse a essentiellement été utilisé chez des vertébrés. Leur utilisation chez *A. vulgare* a donné des résultats inattendus qui semblent liés à la présence de facteurs féminisants et en particulier à l'élément *f*. Des simulations sur ordinateur seront prochainement réalisées pour valider les hypothèses proposées au cours de cette thèse. Il serait aussi intéressant de réaliser de telles analyses chez d'autres espèces présentant des facteurs féminisants (y compris chez des vertébrés) et mettre au point des approches permettant de discriminer les biais de structuration liés au sexe dus à la présence de facteurs féminisants de ceux dus à un biais de dispersion entre mâles et femelles.

- **Phylogéographie et épidémiologie de *Wolbachia***

Une étude phylogéographique d'*A. vulgare* à l'échelle du continent européen, serait intéressante pour comprendre l'histoire de l'invasion de ses populations par *Wolbachia*. Le problème majeur d'une étude à une telle échelle géographique, est l'existence de transferts horizontaux susceptibles de briser le déséquilibre d'association entre *Wolbachia* et un mitotype particulier. Cependant, le déséquilibre d'association est conservé au moins à une échelle régionale (voir Chapitre IV et Rigaud *et al*., 1999). Son analyse peut donc permettre d'identifier une vague d'invasion par *Wolbachia* dans une région donnée. La mise au point de marqueurs génétiques de *Wolbachia* plus variables que *wsp* pourrait aussi aider à retracer la phylogéographie du parasite. Parallèlement, l'analyse des prévalences de *Wolbachia* à une large échelle et leur corrélation avec des données environnementales (notamment climatiques) serait judicieuse pour appréhender les effets de l'environnement sur *Wolbachia*.

- **Dynamique des facteurs sexuels dans les populations naturelles d'*A. vulgare***

L'étude de tous les facteurs impliqués (élément *f*, gène masculinisant, complexe de résistance à la transmission de *Wolbachia*) est évidemment indispensable à la bonne compréhension de la dynamique des facteurs sexuels féminisants chez *A. vulgare*. Le séquençage (en cours de finalisation) du génome de *Wolbachia w*Vul peut ouvrir des pistes pour caractériser et identifier l'élément *f*, si celui-ci est bien issu du génome de *Wolbachia*. Une analyse des avantages et des coûts de ces facteurs, en particulier des gènes de résistance (*M* et *r*), paraît d'autant plus intéressante que l'existence de coûts à la résistance pourrait expliquer une évolution cyclique des fréquences des facteurs féminisants dans les populations. Un suivi de plusieurs populations, par exemple celles échantillonnées dans le Chapitre IV, sur une longue période de temps (20 ou 30 ans) à intervalle de temps régulier, permettrait également d'apporter des informations sur la dynamique du système.

VIII. Annexes

Annexe I. Protocole d'extraction de l'ADN total

Dissection des animaux et digestion des protéines

Les extractions d'ADN ne sont pas réalisées sur des animaux entiers (présence de pigments, terre et autres constituants indésirables dans le tube digestif, etc...) mais sur les ovaires (femelles) ou les utricules des testicules (mâles). Si les animaux sont petits, une partie de la chaine nerveuse peut également être prélevée. Le prélèvement de ces organes nécessite une dissection des animaux.

- Nettoyer les animaux dans un bain de Javel 3%, puis les rincer 2 à 3 fois à l'eau déminéralisée, les déposer dans une boite (avec papier absorbant humide).
- Préparer des tubes Eppendorfs avec 5 µl de protéinase K + 400 µl de Tampon Wilson.

  Composition du tampon Wilson :
  Tris 100 mM
  EDTA 10 mM
  NaCl 100 mM
  SDS 0,1 %
  Dithiothréitol 50 mM
  pH = 8

- Dissection : récupérer les organes désirés dans les tubes déposés dans la glace ; broyer à l'aide d'un pilon.
- Incuber au bain-marie à 37°C pendant 4h.

Purification

- Ajouter ½ volume de Phénol (200 µl) et ½ volume de Chloroforme isoamyle (200 µl). Bien agiter puis centrifuger à 12000 rpm pendant 8 minutes. Récupérer le surnageant.
- Renouveler l'étape précédente.
- Ajouter 1 volume de Chloroforme isoamyle (400 µl). Bien agiter, puis centrifuger à 12000 rpm pendant 8 minutes. Récupérer le surnageant.

Précipitation de l'ADN

- Ajouter 1/10 de volume (40 µl) d'acétate de sodium (3M, pH=5,2) et 1 volume d'isopropanol (400 µl), bien agiter. Incuber une nuit à -20°C.
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 30 minutes à 4°C puis éliminer le surnageant.
- Ajouter 500 µl d'éthanol 70%, centrifuger à 15000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, puis éliminer le surnageant.
- Renouveler l'étape précédente.
- Laisser sécher sous la hotte (environ 30 minutes)
- Reprendre les culots d'ADN dans 100 µl d'eau stérile et conserver à -20°C.

*Annexe II. Séquences de la Cytochrome Oxydase II (ADN mitochondrial) d'*A. vulgare

Les séquences comprennent la région 3' de la cytochrome oxydase II et une région non-codante. Les codons-stop sont indiqués en grisé.

```
AvA  1    GAAGTTACGA ATATTCAGAT TTTAAAAATC TTGAGTTTGA TGCTTATATA GTTATAACTA  60
AvB  1    .......... .......... .......... .......... .......... .......G..  60
AvD  1    .......... G......... .......... .......... .......... ..........  60
AvE  1    .......... .........C .......... ....A..... .......... ..........  60
AvF  1    .......... .......... .........T .......... .........G ..........  60
AvG  1    .......... .......... .........T .......... .........G ..........  60
AvH  1    .......... .......... ..C....... .......... ......C... A.........  60
AvI  1    .......... .......... ..C....... .......... ......C... A.........  60

AvA  61   ATGAGCTTGA AGATAAAAGG TTTCGTGTTT TAGAGGTAGA TAACCATACA ATTATTCCAC  120
AvB  61   .......... .......... .......... .......... .....G.... ..........  120
AvD  61   .......... .......... .......... .......... ...T...... ..........  120
AvE  61   ....A..... .......... .......... .......... ......C... ..........  120
AvF  61   ....A..... .....G.... .......... .......... ...T.G.... ..........  120
AvG  61   ....A..... .....G.... .......... .......... ...T.G.... ..........  120
AvH  61   .C..A..C.. ...C...... .......... .......... ...T...... ..........  120
AvI  61   ....A..C.. ...C...... .......... .......... ...T...... ..........  120

AvA  121  ACTCTTTACA AATCCGAATA TTAATTACTG CGTCTGATGT GATTCACTCT TGAGCTGTTC  180
AvB  121  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  180
AvD  121  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  180
AvE  121  .......... .......... .......... .......... .......... ..G.......  180
AvF  121  .......... ......G... .......... .......... ......T... ..........  180
AvG  121  .......... ......G... .......... .......... ......T... ..........  180
AvH  121  .T........ ......G... .......... .......... ......T... ..........  180
AvI  121  .T........ ......G... .......... .......... ......T... ..........  180

AvA  181  CTAGCCTTGG GGTAAAAGTA GATGCAGTTC CTGGGCGGTT AAATCAACTT AGATTTTTCT  240
AvB  181  .......... .......... ..C....... ....A..... .......... ..........  240
AvD  181  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  240
AvE  181  .......... A......... .......... .......... .......... ........A.  240
AvF  181  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  240
AvG  181  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  240
AvH  181  .......... .......... .......... ....A..... .......... ........T.  240
AvI  181  .......... .......... .......... ....A..... .......... ........T.  240

AvA  241  CTAACCGCAC TGGAATGTTC TATGGGCAAT GTTCTGAAAT TTGTGGAGCT AATCATAGGT  300
AvB  241  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  300
AvD  241  .......A.. .......... .......... .......... .......... ..........  300
AvE  241  .......T.. .......... .......... .......... ......G... ..........  300
AvF  241  .......T.. ......A... .......... .......... .......... ..........  300
AvG  241  .......T.. ......A... .......... .......... .......... ..........  300
AvH  241  .......... ......A... .......... .......... ......G... .....C....  300
AvI  241  .......... ......A... .......... .......... ......G... .....C....  300

AvA  301  TTATACCTAT TGTTTTAGAG GCAGTGCCTT TGGCTAATTT TTTAAATTGA TTAAATAAGT  360
AvB  301  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  360
AvD  301  .......... ......G... .......... .......... .......... ..........  360
AvE  301  .......... .......... T......... .A........ .......... ........A.  360
AvF  301  ....G..... .......... .......... .......... .......... ........A.  360
AvG  301  ....G..... .......... .......... .......... .......... ........A.  360
AvH  301  .......... .......... .......... ...T...... ....G..... ..........  360
AvI  301  .......... .......... .......... ...T...... ....G..... ..........  360
```

```
AvA  361  AA----TAGA TTGGCTGAAT AAA-GCGAAA GGTTTTTAAT CTTTTAATAG AAAAGTATAG  415
AvB  361  ..----.... .......... ...-...... .......... .......... ..........  415
AvD  361  ..----.... .......... ...-...... .......... .......... ..........  415
AvE  361  ..----.... .......... ...-...... .......... .......... ..........  415
AvF  361  ..ATAA.... .......... ...A...... .......... .......... ......G...  420
AvG  361  ..ATAA.... .......... ...A...... .......... .......... ......G...  420
AvH  361  .C----.... .......... ...-...... .......... .......... ....A.....  415
AvI  361  .C----.... .......... ...-...... .......... .......... ....A.....  415

AvA  416  TTAAAAATAA TATAAGGTTG TCAATCTTAA GTTTAGAGAG GTTCCACAAA TAGGTCCTTT  475
AvB  416  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  475
AvD  416  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  475
AvE  416  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  475
AvF  421  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  480
AvG  421  .......... .......... .......... .......... .......... .T........  480
AvH  416  .......... .......... .......... ........G. ..A....... ....G..A..  475
AvI  416  .......... .......... .......... ........G. ..A....... ....G..A..  475

AvA  476  ACCGTGAGTT TTTTTATTCT TTAGGGTATT AAGTTTATGT TTTAGAGTTT TAGTAATTTT  535
AvB  476  .......... .......... ....A..... .......... .......... ..........  535
AvD  476  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  535
AvE  476  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  535
AvF  481  .......... .........C .A..A..... .......... .....G.... ..........  540
AvG  481  .......... .........C .A..A..... .......... .....G.... ..........  540
AvH  476  ...T...... .......... .......... .......... C....G.... ..........  535
AvI  476  ...T...... .......... .......... .......... C....G.... ..........  535

AvA  536  ATATTTTATT TCATCTAATA ACAATATTGT AAAAAAAAGAT CAAATTATTA CTAGATTTTA  595
AvB  536  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  595
AvD  536  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  595
AvE  536  .......... .......... .---...... ......T.G. ....A..... .....C....  592
AvF  541  .......... .......... .T........ G......... .......... ..........  600
AvG  541  .......... .......... .T........ G......... .......... ..........  600
AvH  536  .......... .......... .T........ .......... .......... ..........  595
AvI  536  .......... .......... .T........ .......... .......... ..........  595

AvA  596  TTATTGACTA TGATAA  611
AvB  596  .......... ......  611
AvD  596  .......... ......  611
AvE  593  .......T.. ......  608
AvF  601  .......T.. ......  616
AvG  601  .......T.. ......  616
AvH  596  .......T.. ......  611
AvI  596  .......T.. ......  611
```

Taille de fragments attendus après digestion enzymatique des produits PCR obtenus avec les amorces CO2dir et 5r3 :

Mitotype	Enzyme Ssp I	Enzyme TspR I
AvA	96, 101, 127, 421	26, 74, 302, 343
AvD	96, 228, 421	26, 302, 417
AvE	21, 75, 101, 127, 418	26, 299, 417
AvF	96, 101, 244, 309	307, 417, 443

Annexe III. Sites d'études de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et des populations périphériques à celles-ci.

Population A

Population D

Population B

Population E

Population C

Population F

Population G

Population K, vue du fond de la plate-forme

Population H

Population K, vue de la route

Population J

Population L

Population M

Population Q

Population N

Population R

Population O

Population PA

Population PB

Population PE

Population PC

Population PF

Population PD

Population PG

Annexe IV. Résultats complémentaires des Chapitres V et VI

Tableau A-1 Distribution des mitotypes et statuts d'infection dans les échantillons collectés dans la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et dans sept populations périphériques. i indiquent les intersexués femelles.

			Mâles				Femelles												Total
							Non-infectées				*w*VulC				*w*VulM				
Echantillons			AvA	AvD	AvE	AvF	AvA	AvD	AvE	AvF	AvA	AvD	AvE	AvF	AvA	AvD	AvE	AvF	
Echantillons d'adultes collectés dans la RBI de Chizé	2003	C		5	4	6				4					1				20
		E			1	6		1		1									9
		F		1	1	8		1	1	3									15
		G		2		2		4		3		5			3				19
		H	1	1		6				4		5							17
		J										10			2				12
		K		2		5		1	1	6									15
		M	1	3		3				2		2			4				15
		O	2	3			1		1	3		5			3				18
		Q				3	1	1		6		3							14
	2004	A	1	3	3	5	2	3	2	1	1	9			1				31
		B		4		1				1		23(1i)							30
		C	1	1	1	10			2	5		3			1				24
		D	1		1	3		2	1	4		5			7				24
		E	4	3	1	6			1	1		1			4				21
		F		2		7				2		8			1				20
		G	1	2		4		1		4		13(1i)			2				28
		H	1		3	11				1		19		2					37
		J		7		1		2		3(2i)	1	11							27
		K	1	2	3	9	1	1	1	8		2			4				32
		L		1	3	15			4	7									30
		M	2	1	1	4	1	1	1	7		1			6				25
		N	5	1	3	6	2		3	6					5			1	32
		O	7	4	2	6	1			7		3			8				38
		Q		3	2	6		1	2	5(1i)	1	10			1				32
		R	1	2	1	1	2	1				4	3		9				24
	2005	F			1	3		1	1	3		1							10
		G		5		2		1		3		7				1			19
		H		3		9			1	2		7		2	1				25
		J		4		3			1	1		10		1		1			21
		K							2	10									12
		M	3	2	2	2	2	2		5	2				2				22
		O	3	1		2	1		1	14		7			7		1		37
		Q		1		3	1			2		3				3		1	14
Echantillons de juvéniles RBI de Chizé		Bp		19	1	2			1			18							41
		Hp		1		2		1				15		1		1		1	22
		Jp		3	2	6				4		9							24
		Op1	3	1		1	1			7		1			5				
		Op2	3	1	1	2	1		2			3			6				
		Qp		3	1	4				3		7			1				19
		Rp	6	1		1	1	2	1	1		7			14				34

Tableau A-1 Suite.

						Femelles													
		Mâles				Non-infectées				*w*VulC				*w*VulM				Total
	Echantillons	AvA	AvD	AvE	AvF	AvA	AvD	AvE	AvF	AvA	AvD	AvE	AvF	AvA	AvD	AvE	AvF	
Populations périphériques	PA	4	1	7	1	3		9										25
	PB		6	4	14		4	1	10		2			1				42
	PC				21		1	1	21									44
	PD	4	2	5	3	4		2						13			1	34
	PE	8	5		2	13	3(1i)	5	1			1						39
	PF				14		1	1	32									48
	PG	3	14		4	3	9		4		3			1				41

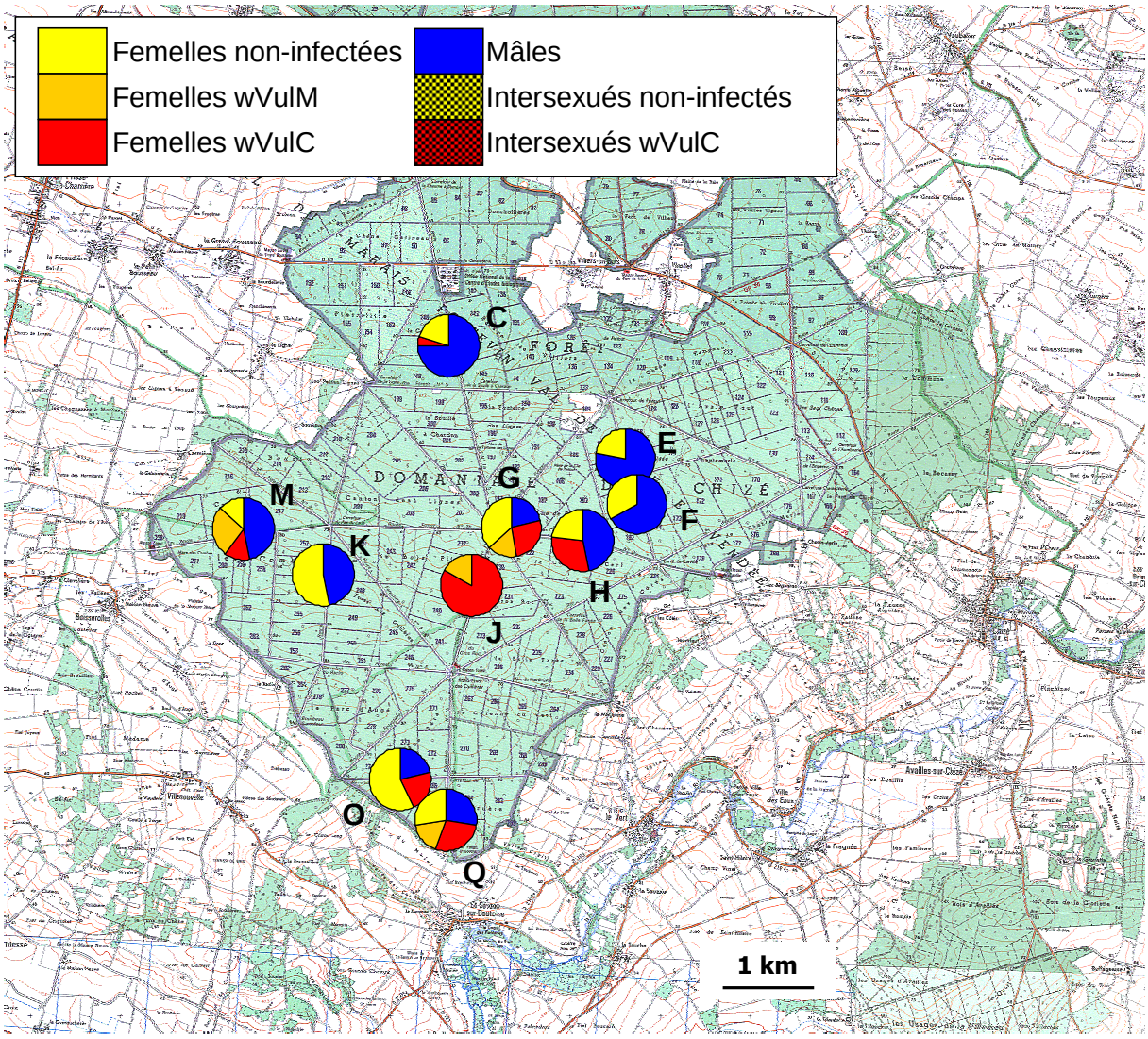


Figure A-1 Prévalence de *Wolbachia* et proportions des sexes au sein de dix sous-populations d'*A. vulgare* échantillonnées en 2003 au sein de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé.

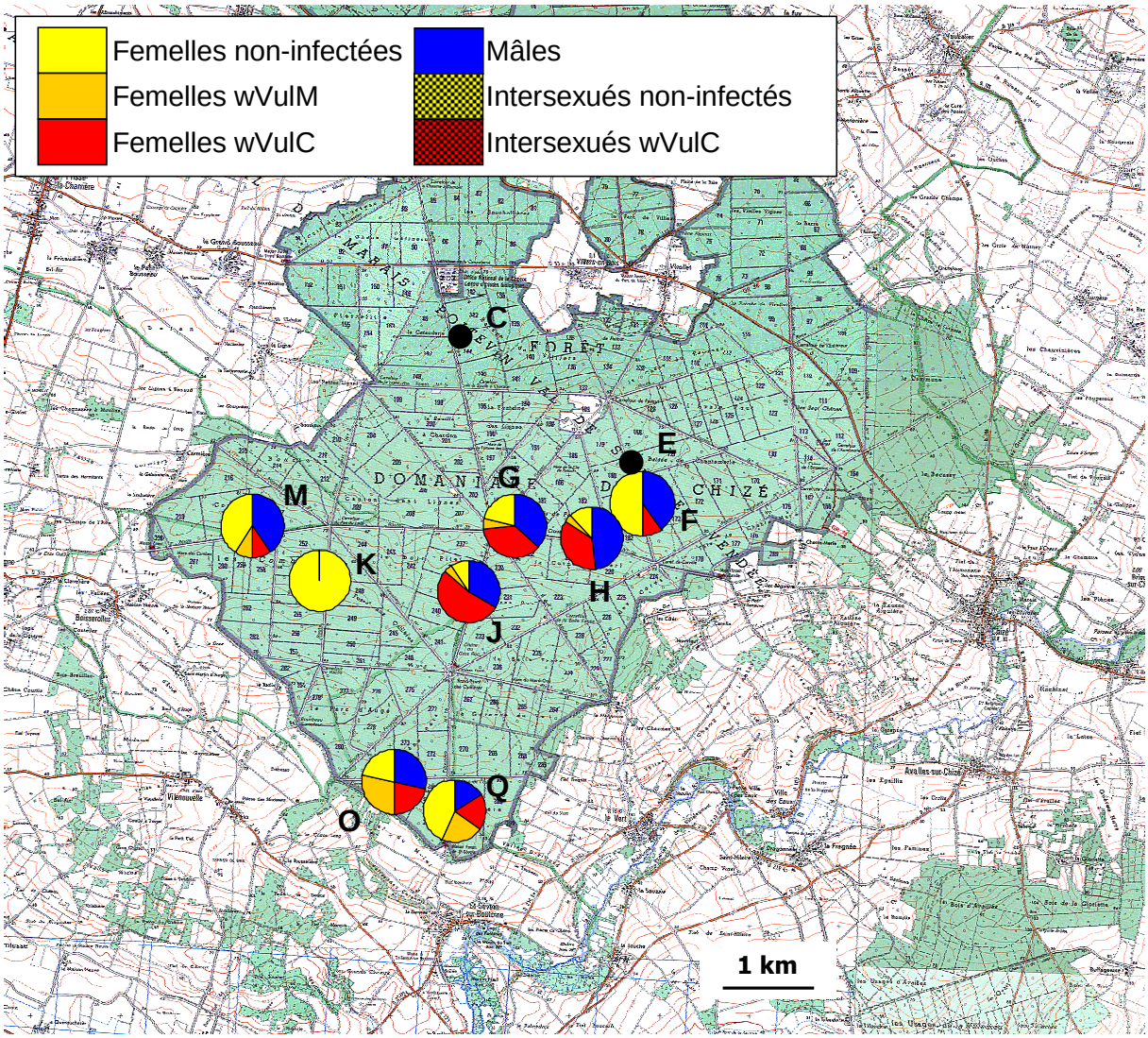


Figure A-2 Prévalence de *Wolbachia* et proportions des sexes au sein de dix sous-populations d'*A. vulgare* échantillonnées en 2005 au sein de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé. Il n'a pas été possible d'échantillonner un seul individu sur la plate-forme C (représentée par un disque noir), suggérant que cette sous-population s'est éteinte ou du moins que ces effectifs ont fortement diminué entre 2004 et 2005.

Tableau A-2 Probabilité des tests de déséquilibre de liaison entre les loci microsatellites au sein de la RBI et dans les populations périphériques. 4600 permutations ont été effectuées pour les tests intra-population et 200 permutations ont été effectuées pour les tests sur l'échantillon complet.

Paire de loci	Av1/Av2	Av1/Av5	Av1/Av6	Av1/Av8	Av2/Av5	Av2/Av6	Av2/Av8	Av5/Av6	Av5/Av8	Av8/Av6
C	0,921	1,000	0,902	1,000	1,000	0,889	1,000	1,000	1,000	0,801
E	0,804	1,000	0,926	1,000	1,000	0,587	0,157	1,000	1,000	1,000
F	**0,038**	1,000	0,901	0,479	1,000	0,926	**0,007**	0,302	1,000	0,159
G	0,636	0,224	0,561	1,000	1,000	0,921	0,150	1,000	1,000	0,979
H	0,877	1,000	1,000	0,062	1,000	0,538	0,722	1,000	1,000	1,000
J	0,841	1,000	0,211	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
K	0,910	1,000	0,674	1,000	1,000	0,339	0,539	1,000	1,000	1,000
M	0,399	1,000	0,679	1,000	1,000	0,301	1,000	1,000	1,000	1,000
O	0,193	1,000	0,434	1,000	1,000	**0,045**	1,000	1,000	1,000	1,000
Q	0,845	1,000	0,332	1,000	0,164	0,053	1,000	0,305	1,000	1,000
PA	0,151	0,336	0,417	1,000	0,129	0,739	1,000	1,000	1,000	1,000
PB	0,545	1,000	0,532	0,237	1,000	0,998	1,000	1,000	1,000	0,661
PC	0,959	1,000	0,309	0,746	0,233	0,754	0,707	1,000	1,000	0,713
PD	0,828	1,000	0,164	0,687	0,305	0,180	0,844	1,000	1,000	0,406
PE	**0,029**	**0,040**	0,915	1,000	0,557	0,511	**0,019**	1,000	1,000	1,000
PF	0,774	0,371	0,691	0,519	1,000	0,161	0,834	1,000	1,000	0,308
PG	0,560	1,000	0,988	0,770	1,000	**0,025**	0,792	1,000	1,000	1,000
Bp	0,231	1,000	0,968	0,605	0,598	0,788	0,681	**0,040**	1,000	0,710
Hp	0,757	1,000	0,733	0,621	1,000	0,552	0,723	1,000	1,000	1,000
Jp	0,258	1,000	0,183	1,000	1,000	0,439	1,000	1,000	1,000	0,763
Qp	0,988	0,587	0,468	1,000	0,631	**0,012**	1,000	0,511	1,000	1,000
Op1	0,247	1,000	0,363	0,411	1,000	0,598	1,000	1,000	1,000	0,810
Op2	0,767	0,091	0,773	0,758	1,000	0,795	0,770	1,000	1,000	0,630
Total	0,365	0,140	0,590	0,640	0,155	0,200	0,510	0,380	1,000	0,925

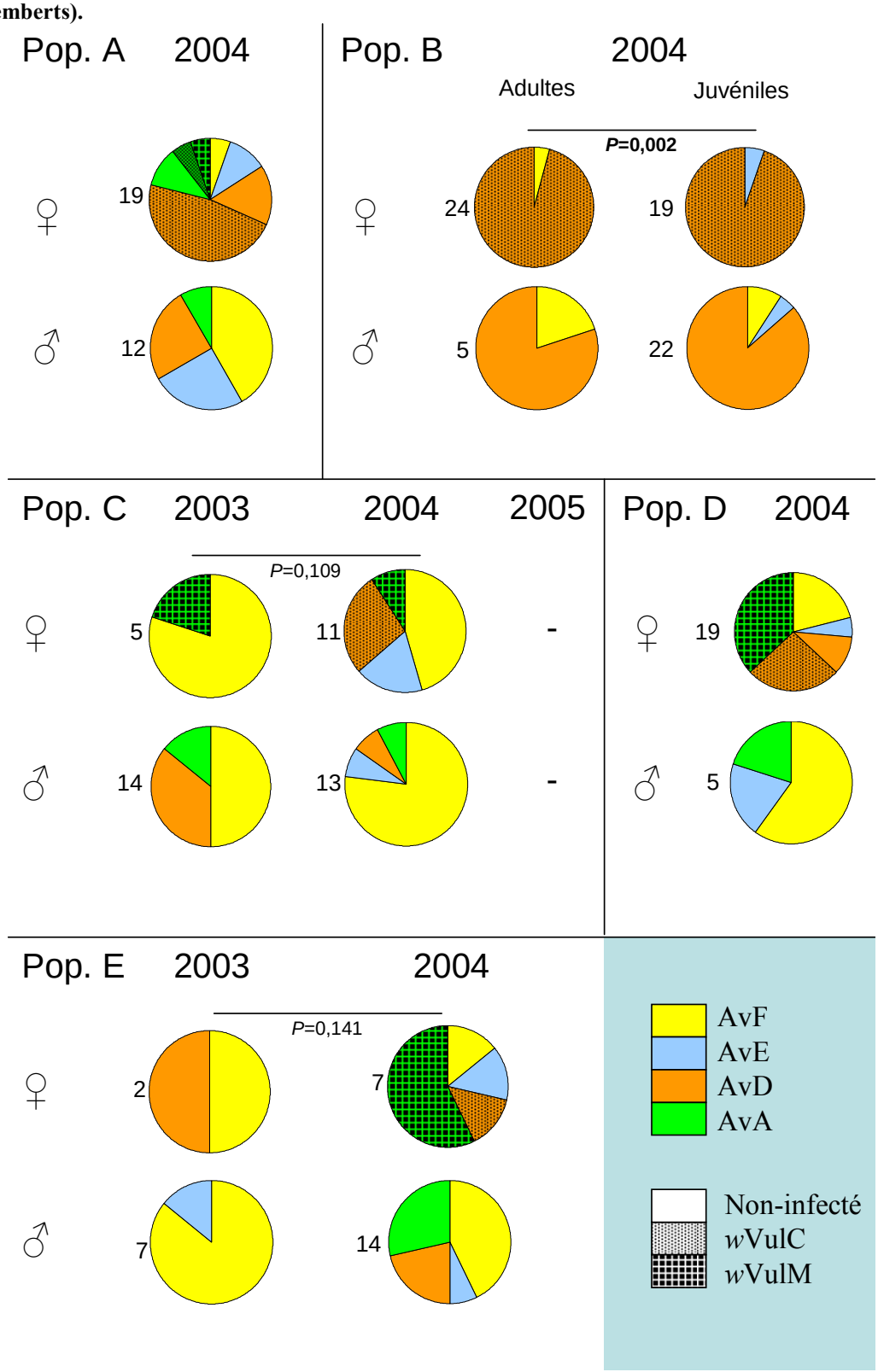
Tableau A-3 Différenciation génétique du marqueur mitochondrial pour les échantillons de la RBI de Chizé collectés en 2003 : valeurs F_{ST} par paires de populations, estimées selon Weir et Cockerham (1984) dans la demi-matrice supérieure et les probabilités associées aux tests exacts de différenciation génique dans la demi matrice inférieure. Les valeurs F_{ST} ont été testées par 10000 permutations des individus entre populations. Les valeurs significatives au seuil 5% avant corrections de Bonferroni sont indiquées en gras. Les valeurs significatives après corrections séquentielles de Bonferroni sont soulignées.

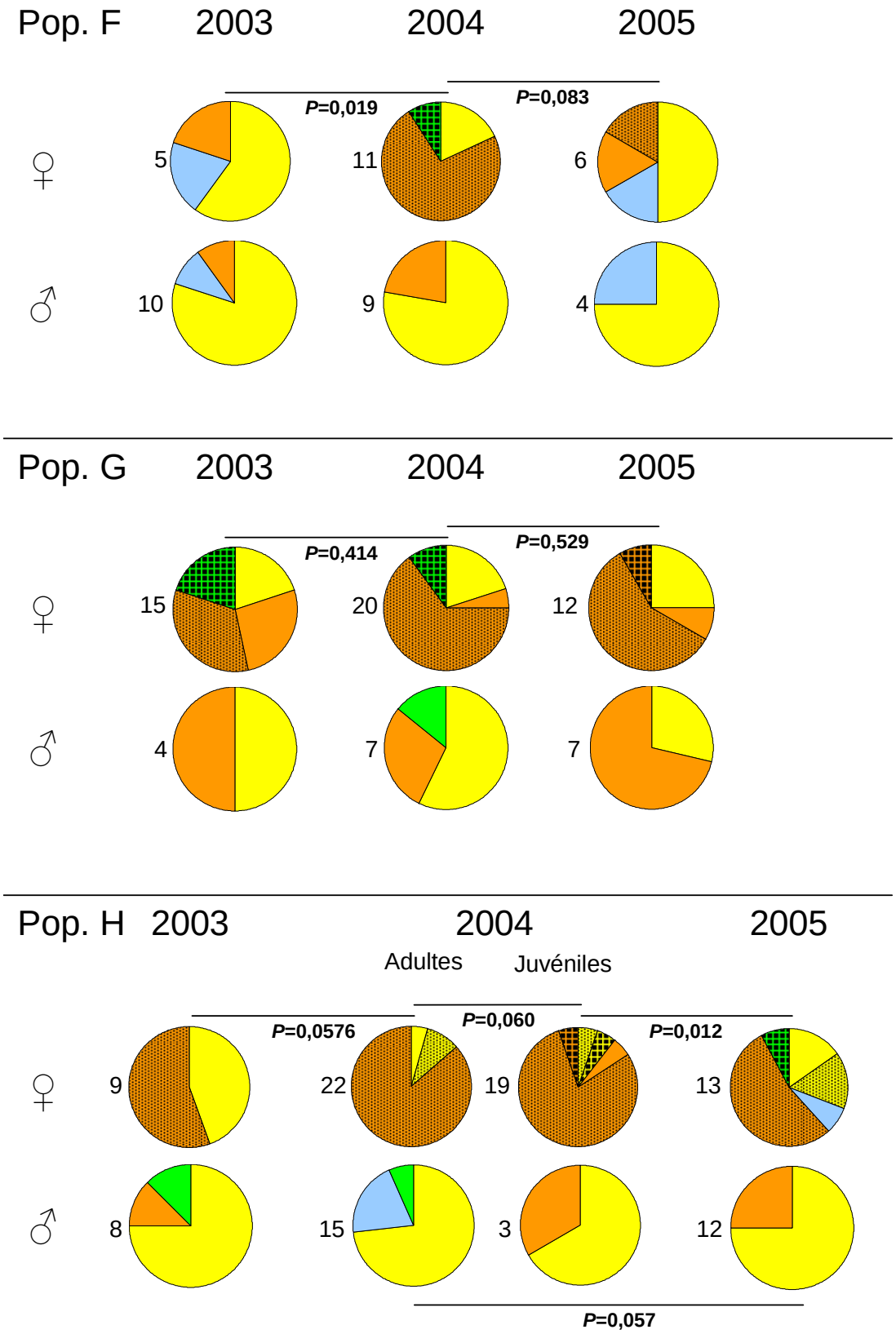
	C	E	F	G	H	J	K	M	O	Q
C		0,008	0,006	**0,105**	-0,008	**0,346**	0,008	0,051	**0,114**	-0,011
E	0,688		-0,094	**0,284**	0,022	**0,610**	-0,081	**0,178**	**0,290**	-0,025
F	0,613	1,000		**0,270**	0,025	**0,566**	-0,060	**0,176**	**0,282**	-0,015
G	**0,020**	**0,016**	**0,001**		0,080	**0,065**	0,236	0,014	-0,007	**0,126**
H	0,282	0,296	0,155	0,215		**0,366**	-0,011	0,046	**0,132**	-0,062
J	**0,000**	**0,000**	**0,000**	0,251	**0,002**		**0,543**	**0,225**	0,110	**0,432**
K	0,553	1,000	1,000	**0,006**	0,490	**0,000**		**0,157**	**0,264**	-0,046
M	0,057	**0,033**	**0,011**	0,254	0,156	**0,027**	**0,009**		-0,031	0,060
O	**0,023**	**0,009**	**0,001**	0,424	**0,023**	0,177	**0,002**	0,677		**0,162**
Q	0,374	0,495	0,351	0,119	1,000	**0,000**	0,762	0,199	**0,027**	

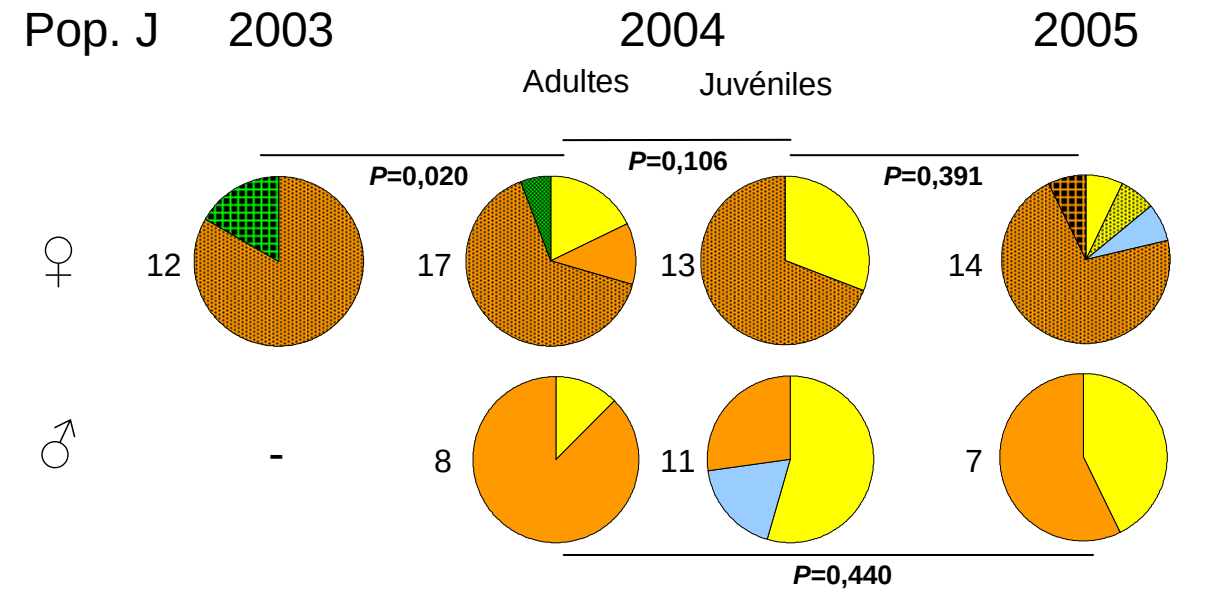
Tableau A-4 Différenciation génétique du marqueur mitochondrial pour les échantillons de la RBI de Chizé collectés en 2005 : valeurs F_{ST} par paires de populations, estimées selon Weir et Cockerham (1984) dans la demi-matrice supérieure et les probabilités associées aux tests exacts de différenciation génique dans la demi matrice inférieure. Les valeurs F_{ST} ont été testées par 10000 permutations des individus entre populations. Les valeurs significatives au seuil 5% avant corrections de Bonferroni sont indiquées en gras. Les valeurs significatives après corrections séquentielles de Bonferroni sont soulignées.

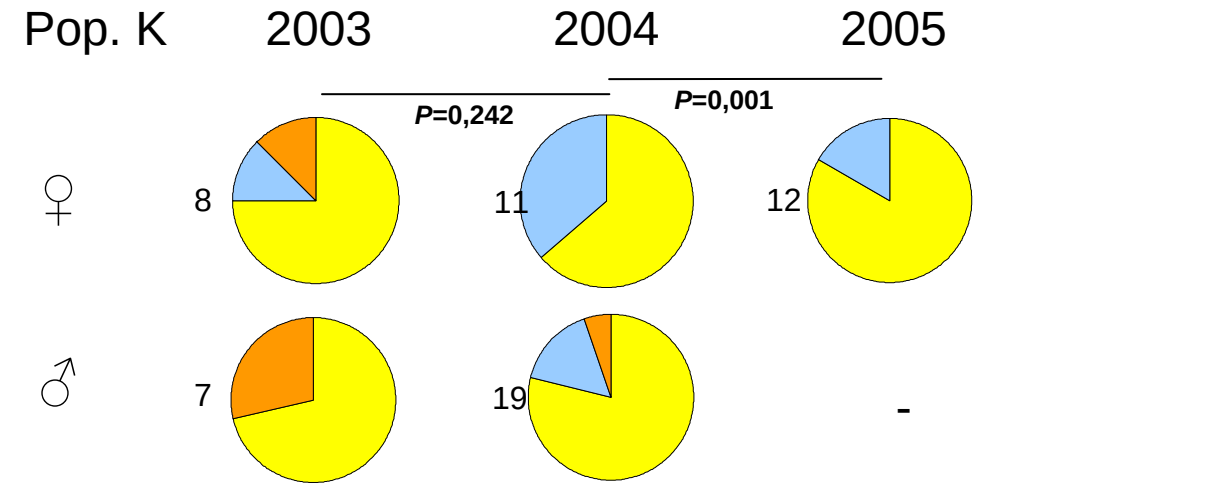
	F	G	H	J	K	M	O	Q
F		**0,277**	-0,009	**0,254**	0,015	0,103	0,037	0,046
G	**0,006**		0,116	-0,048	**0,534**	**0,271**	**0,223**	0,027
H	0,309	0,078		**0,112**	**0,176**	**0,116**	0,047	-0,040
J	**0,014**	1,000	0,084		**0,509**	**0,255**	**0,213**	0,027
K	0,402	**0,000**	**0,016**	**0,000**		**0,255**	**0,167**	**0,287**
M	**0,060**	**0,000**	**0,011**	**0,000**	**0,004**		-0,017	**0,104**
O	0,113	**0,000**	**0,047**	**0,000**	**0,008**	0,716		0,049
Q	0,135	0,205	0,919	0,245	**0,004**	**0,043**	0,145	

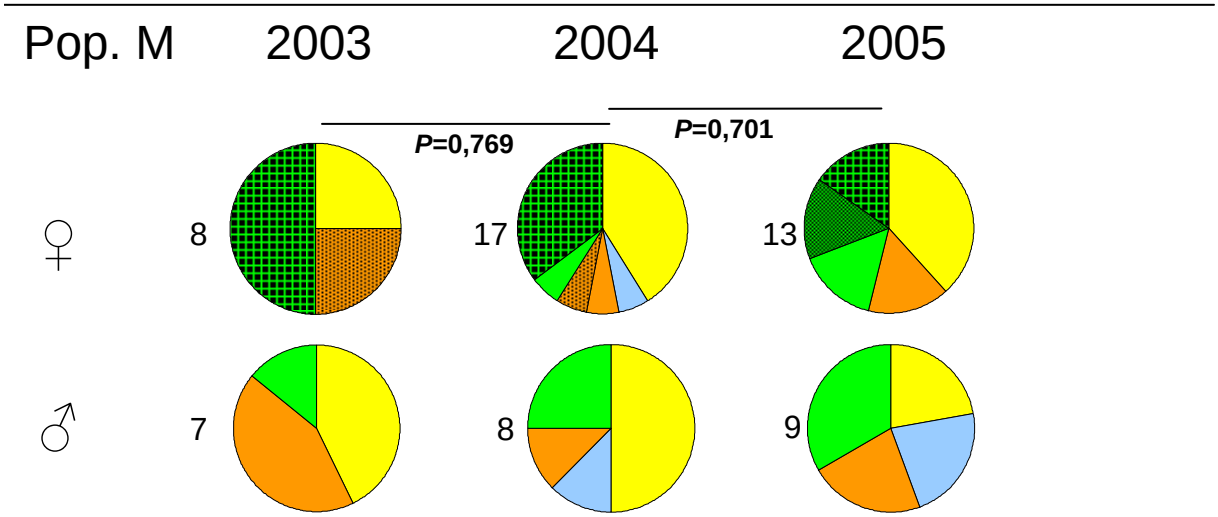
Figure A-3 Prévalence de *Wolbachia* et fréquences des mitotypes dans les échantillons collectés en 2003, 2004 et 2005 au sein de la Réserve Biologique Intégrale de Chizé et sept populations périphériques. Les données sont indiquées pour chaque sexe. La taille des échantillons sont indiquées à gauche des camemberts. Lorsqu'un échantillonnage de juvéniles (moins de 2mm de diamètre) a été possible, il a été traité séparément des autres individus (plus de 2,5 mm de diamètre). Des tests exacts de Fisher ont été effectués pour comparer les échantillons d'une année sur l'autre et entre générations (valeurs *P* au dessus des camemberts).

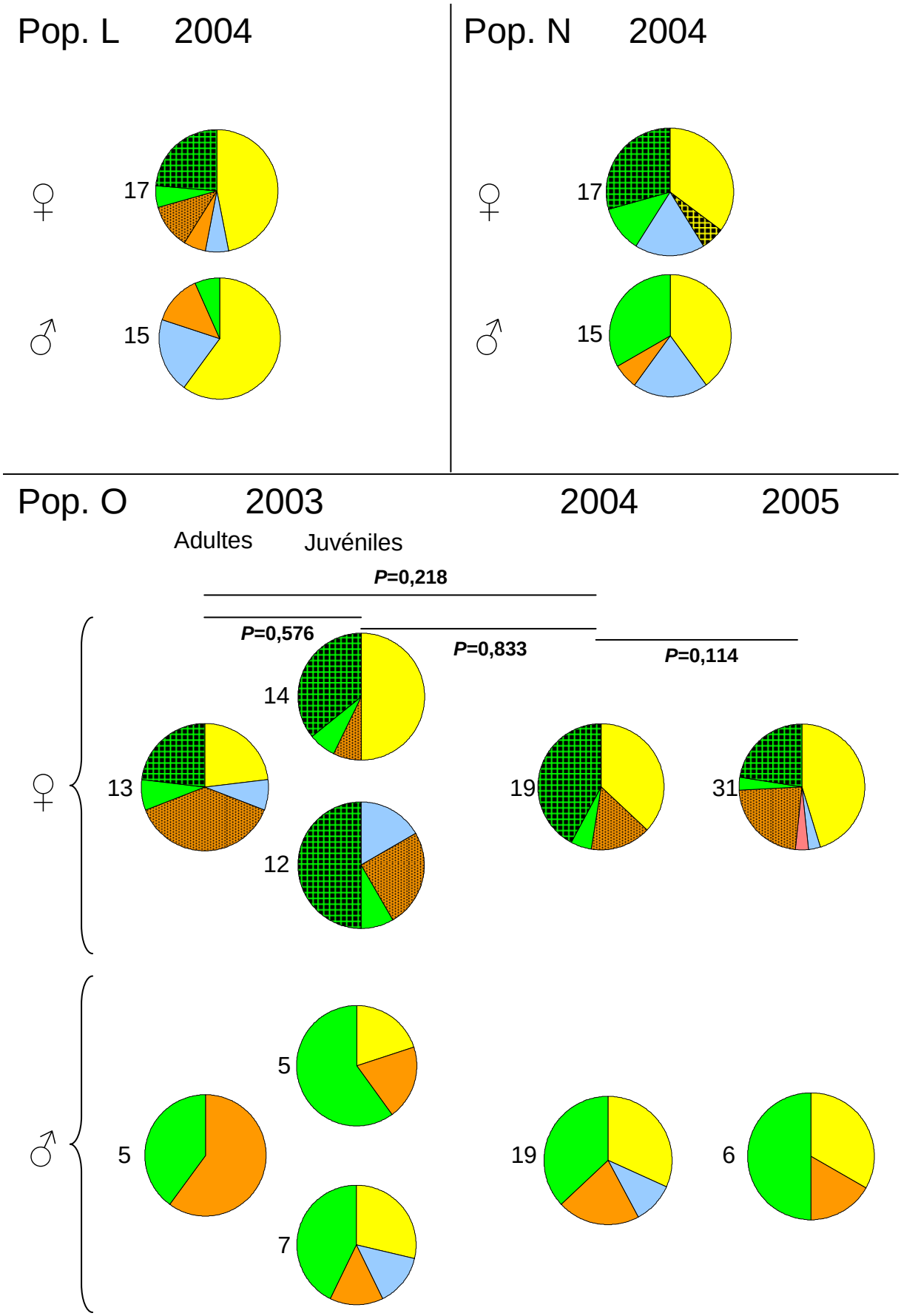


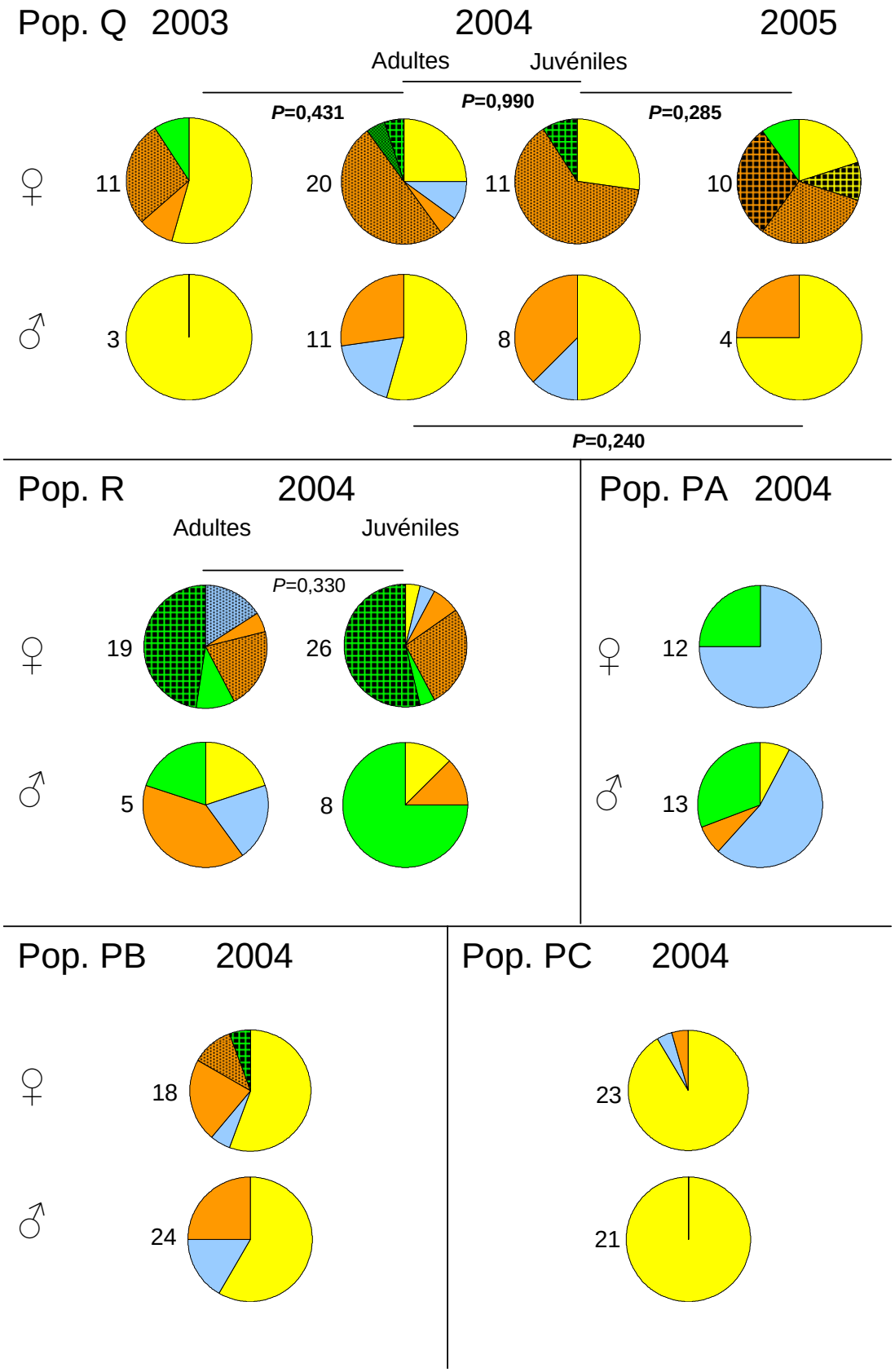

Pop. F
2003
2004
2005
P=0,019
P=0,083
♀
5
11
6
♂
10
9
4
Pop. G
2003
2004
2005
P=0,414
P=0,529
♀
15
20
12
♂
4
7
7
Pop. H
2003
2004
2005
Adultes
Juvéniles
P=0,0576
P=0,060
P=0,012
♀
9
22
19
13
♂
8
15
3
12
P=0,057


Pop. J
2003
2004
2005
Adultes
Juvéniles
P=0,020
P=0,106
P=0,391
P=0,440
♀
♂
12
17
13
14
-
8
11
7


Pop. K
2003
2004
2005
P=0,242
P=0,001
♀
♂
8
11
12
7
19
-

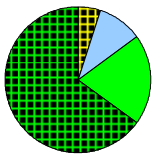

Pop. M
2003
2004
2005
P=0,769
P=0,701
♀
♂
8
17
13
7
8
9


Pop. L 2004
♀
17
♂
15
Pop. N 2004
♀
17
♂
15
Pop. O
2003
2004
2005
Adultes
Juvéniles
P=0,218
P=0,576
P=0,833
P=0,114
♀
13
14
12
19
31
♂
5
5
7
19
6

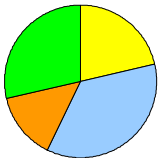

Pop. Q 2003
2004
2005
Adultes
Juvéniles
P=0,431
P=0,990
P=0,285
P=0,240
♀
♂
11
20
11
10
3
11
8
4
Pop. R 2004
Adultes
Juvéniles
P=0,330
19
26
5
8
Pop. PA 2004
12
13
Pop. PB 2004
18
24
Pop. PC 2004
23
21

Pop. PD 2004

♀ 20

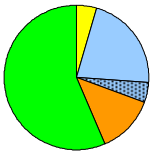


♂ 14

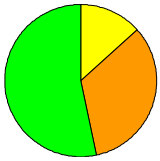


Pop. PE 2004

♀ 20

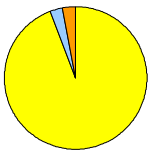


♂ 14

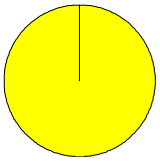


Pop. PF 2005

♀ 34

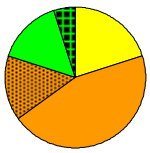


♂ 14



Pop. PG 2005

♀ 20



♂ 21

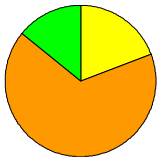


Tableau A-5 Valeurs F_{ST} par sexe et par paires de (sous-)populations sur les échantillons prélevés en 2004 au sein de la RBI de Chizé et dans les populations périphériques (prélevés en 2004 ou 2005). Les valeurs au dessus de la diagonale correspondent aux F_{ST} calculés sur les mâles et les valeurs sous la diagonale aux F_{ST} calculés sur les femelles. Les valeurs en gras sont significatives au seuil de 5% avant correction de Bonferroni. Les valeurs soulignées sont significatives après correction de Bonferroni (*k*=253 pour chaque sexe).

	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N	O	Q	R	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG
A		0,149	0,072	-0,071	-0,028	0,065	-0,053	0,063	**0,277**	0,107	-0,04	-0,064	-0,009	0,008	-0,072	-0,096	0,106	-0,031	**0,448**	-0,009	**0,154**	**0,376**	**0,148**
B	**0,184**		**0,471**	0,375	0,188	0,410	0,171	**0,494**	-0,168	**0,528**	**0,303**	0,253	**0,296**	0,196	0,183	-0,016	**0,391**	0,231	**0,905**	**0,247**	0,234	**0,87**	-0,094
C	**0,147**	**0,531**		-0,078	0,073	-0,057	-0,018	-0,048	**0,580**	-0,050	-0,028	-0,002	0,101	**0,156**	0,016	0,221	**0,381**	0,014	0,139	**0,220**	**0,363**	0,091	**0,394**
D	0,04	**0,399**	0,038		-0,072	0,008	-0,086	-0,109	**0,531**	-0,034	-0,118	-0,162	-0,099	-0,017	-0,061	0,000	0,143	-0,037	**0,475**	-0,004	0,193	0,372	**0,319**
E	**0,176**	**0,697**	0,106	-0,025		0,075	-0,077	0,094	**0,308**	**0,147**	0,005	-0,095	-0,043	-0,051	-0,002	-0,069	**0,156**	0,032	**0,423**	0,016	0,051	**0,356**	**0,150**
F	-0,025	0,119	0,143	0,086	**0,291**		-0,065	0,023	**0,545**	-0,01	-0,011	0,029	0,147	**0,167**	-0,018	0,195	**0,420**	-0,015	0,267	**0,249**	**0,363**	0,195	**0,334**
G	-0,004	**0,128**	**0,148**	0,093	**0,295**	-0,074		0,043	0,336	0,064	-0,052	-0,103	0,003	-0,006	-0,082	-0,046	**0,259**	-0,054	**0,455**	0,084	0,142	**0,364**	0,142
H	**0,089**	0,012	**0,349**	**0,27**	**0,533**	-0,023	0,009		**0,592**	-0,047	-0,034	0,004	0,084	**0,166**	0,028	**0,224**	**0,329**	0,029	**0,204**	**0,186**	**0,379**	0,152	**0,425**
J	0,012	0,08	**0,203**	**0,145**	**0,369**	-0,078	-0,05	-0,029		**0,618**	**0,422**	**0,396**	**0,402**	**0,298**	**0,324**	0,136	**0,477**	**0,346**	**0,921**	**0,349**	**0,324**	**0,896**	-0,011
K	**0,412**	**0,764**	0,027	**0,262**	**0,3**	**0,445**	**0,433**	**0,62**	**0,493**		0,103	0,067	**0,160**	**0,228**	0,042	**0,297**	**0,415**	0,034	**0,135**	**0,266**	**0,441**	0,096	**0,450**
L	**0,202**	**0,559**	-0,03	0,021	0,035	**0,217**	**0,218**	**0,415**	**0,279**	-0,009		-0,062	0,018	0,070	-0,061	0,047	**0,220**	-0,04	**0,275**	0,083	**0,257**	**0,217**	**0,278**
M	**0,226**	**0,599**	0,026	0,019	-0,025	**0,268**	**0,268**	**0,466**	**0,331**	**0,16**	-0,046		-0,085	-0,054	-0,045	-0,058	0,136	-0,015	**0,444**	-0,009	0,098	**0,358**	**0,213**
N	**0,29**	**0,654**	0,051	0,077	-0,013	**0,346**	**0,346**	**0,532**	**0,406**	0,119	-0,013	-0,04		-0,035	0,044	-0,024	0,079	**0,078**	**0,443**	-0,025	0,088	**0,378**	**0,252**
O	**0,218**	**0,586**	0,069	0,008	-0,038	**0,264**	**0,264**	**0,459**	**0,326**	**0,235**	-0,022	-0,05	-0,009		0,063	-0,076	**0,109**	**0,102**	**0,468**	-0,006	0,003	**0,411**	**0,150**
Q	-0,004	**0,227**	0,021	0,028	**0,171**	-0,032	-0,019	0,093	0,004	**0,271**	**0,103**	**0,153**	**0,215**	**0,162**		-0,025	**0,220**	-0,069	**0,394**	0,077	**0,234**	**0,32**	**0,184**
R	**0,155**	**0,567**	**0,212**	0,03	-0,075	**0,28**	**0,284**	**0,46**	**0,339**	**0,404**	**0,161**	**0,109**	**0,134**	**0,085**	**0,2**		0,032	0,042	**0,738**	-0,081	-0,018	**0,66**	-0,027
PA	**0,423**	**0,801**	**0,318**	**0,332**	**0,277**	**0,55**	**0,536**	**0,691**	**0,587**	**0,37**	**0,359**	**0,346**	**0,283**	**0,385**	**0,396**	**0,301**		**0,266**	**0,712**	-0,036	**0,199**	**0,656**	**0,346**
PB	**0,205**	**0,507**	-0,052	**0,099**	**0,218**	**0,163**	**0,161**	**0,341**	**0,212**	0,104	0,011	0,085	**0,136**	**0,123**	0,058	**0,306**	**0,45**		**0,270**	**0,126**	**0,273**	**0,225**	**0,225**
PC	**0,61**	**0,863**	**0,258**	**0,454**	**0,607**	**0,649**	**0,594**	**0,752**	**0,659**	**0,207**	**0,249**	**0,334**	**0,346**	**0,393**	**0,462**	**0,621**	**0,732**	**0,199**		**0,569**	**0,683**	0,000	**0,676**
PD	**0,475**	**0,826**	**0,463**	**0,259**	0,043	**0,61**	**0,578**	**0,736**	**0,641**	**0,602**	**0,332**	**0,237**	**0,234**	**0,201**	0,481	**0,106**	**0,532**	**0,523**	**0,767**		0,088	**0,504**	**0,218**
PE	**0,223**	**0,601**	**0,201**	0,072	-0,08	**0,34**	**0,343**	**0,505**	**0,395**	**0,346**	**0,151**	**0,094**	0,084	**0,088**	0,241	-0,024	**0,207**	**0,307**	**0,581**	0,08		**0,628**	**0,151**
PF	**0,68**	**0,89**	**0,361**	**0,535**	**0,696**	**0,725**	**0,664**	**0,8**	**0,726**	**0,303**	**0,331**	**0,417**	**0,429**	**0,473**	**0,544**	**0,688**	**0,793**	**0,281**	-0,033	**0,811**	**0,647**		**0,630**
PG	-0,023	**0,209**	0,089	0,014	**0,169**	-0,047	-0,032	0,083	-0,007	**0,364**	**0,133**	**0,169**	**0,248**	**0,16**	-0,031	**0,18**	**0,461**	**0,117**	**0,531**	**0,47**	**0,243**	**0,607**	

Tableau VI-6 Valeurs F_{ST} par sexe et par paires de sous-populations sur les échantillons de juvéniles prélevés en 2003 au sein de la RBI de Chizé. Les valeurs au dessus de la diagonale correspondent aux F_{ST} calculés sur les mâles et les valeurs sous la diagonale aux F_{ST} calculés sur les femelles. Les valeurs en gras sont significatives au seuil de 5% avant correction de Bonferroni. Les valeurs soulignées sont significatives après correction de Bonferroni (*k*=21 pour chaque sexe).

	Op1	Op2	Bp	Hp	Jp	Qp	Rp
Op1		-0,152	**0,529**	0,142	**0,195**	0,166	-0,152
Op2	0,163		**0,473**	0,011	0,067	0,055	-0,014
Bp	**0,649**	**0,570**		0,464	**0,405**	**0,327**	**0,632**
Hp	**0,568**	**0,510**	0,002		-0,209	-0,243	0,395
Jp	**0,330**	**0,347**	**0,208**	0,065		-0,106	**0,368**
Qp	**0,249**	**0,247**	**0,211**	0,078	-0,077		**0,358**
Rp	**0,177**	-0,039	**0,470**	**0,422**	**0,304**	**0,212**	

Annexe V. Publications parues au cours de la thèse

VERNE S., PUILLANDRE N., BRUNET G., GOUIN N., SAMOLLOW P. B., ANDERSON J. D., GRANDJEAN F., 2006 - Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare.* ***Molecular Ecology Notes*** 6(2):328-330

GRANDJEAN F., GOUIN N., VERNE S., DELAUNAY C., PATRI S., 2005 – Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus.* ***Molecular Ecology Notes*** 5(3):507-509

VERNE S., MOREAU J., CAUBET Y., BOUCHON D. & GRANDJEAN F., 2007 – Male mating success between two parturial moult in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* revealed by the use of microsatellite loci. ***Journal of Crustacean Biology*** 27(2): 217-219

VERNE S., JOHNSON M., BOUCHON D. & GRANDJEAN F., 2007 - Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. ***Gene*** 397(1-2):58-66

Molecular Ecology Notes (2005) **5**, 507–509 doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00972.x

PRIMER NOTE

Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*

FRÉDÉRIC GRANDJEAN,* NICOLAS GOUIN,*† SÉBASTIEN VERNE,* CARINE DELAUNAY* and SYLVIE PATRI*‡

**Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers, 40 Avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France, †Department of Genetics, Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX 78245-0549, USA, ‡IBPC, UMR CNRS 6187, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Université de Poitiers, 86022, Poitiers cedex, France*

Abstract

We developed a set of six polymorphic microsatellite loci for the woodlouse, *Porcellionides pruinosus*. We screened 43 individuals from three French populations and found that locus-specific allelic diversity ranges from 3 to 17 alleles (mean = 9.8) and observed heterozygosity ranges from 0.51 to 0.89 (mean = 0.77). These are the first microsatellites loci reported from the woodlouse.

Keywords: crustacea, Isopoda, microsatellites, *Porcellionides pruinosus*

Received 5 December 2004; revision accepted 17 February 2005

Porcellionides pruinosus is considered to be the most widely distributed terrestrial isopod across the world (Vandel 1960). This species harbours *Wolbachia* bacteria, which are intracytoplasmic, alpha-proteobacteria that are known to modify the reproduction of their crustacean hosts by inducing cytoplasmic incompatibility or feminization (Bandi *et al*. 2001). In the *P. pruinosus* complex, *Wolbachia* induces the feminization of genetic males. The host reproduction changes caused by *Wolbachia* enhance the spread of the symbiont in infected populations (Werren & O'Neill 1997). As a consequence, the infected cytoplasm increases in frequency by hitch-hiking at the expense of uninfected cytoplasm. In *P. pruinosus*, the populations almost entirely infected with *Wolbachia* showed no mitochondrial polymorphism (Marcadé *et al*. 1999), which contrasts with the general pattern of the mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism observed in other woodlouse such as the cosmopolitan species *Armadilli-dium vulgare* (Rigaud *et al*. 1999). The use of nuclear genetic markers with higher resolution appears essential in order to understand the genetic structure of *P. pruinosus* and the role of the feminizing factor in the genetic polymorphism of this species. In the present study, we report the isolation and characterization of six microsatellite loci for *P. pruinosus*.

Correspondence: F. Grandjean, Fax: +33 (0)5 49 45 40 15; E-mail: frederic.grandjean@univ-poitiers.fr

Microsatellites were developed following the methods described by Estoup & Martin (personal communication). DNA for cloning was isolated from ovaries of one *P. pruinosus* specimen using proteinase K phenol–chloroform (Kocher *et al*. 1989). Total DNA were digested with *Sau*3AI restriction enzyme and fragments were separated on a 1.7% agarose gel. Fragments ranging in size from 400 to 900 bp were isolated and purified using a DEAE NA45 cellulose membrane (Schleicher & Schuell) and ligated into the plasmid vector pUC18/*Bam*HI (Pharmacia). The XL1-Blue competent cells (Stratagene) were transformed with ligation products. Transformed cells were grown on LB medium agar, transferred onto nylon membranes (Hybond-N +, Amersham) and then screened using DIG-end-labelled $(GT)_{10}(TC)_{10}$ and $(CAC)_5(CA)$ probes. Among the 942 clones of the partial library screened, 45 (5%) were identified as positive and were isolated. DNA from 30 positives was sequenced using the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequen-cing Ready Reaction Kit and analysed using an ABI PRISM 310 automated sequencer. Primer sets were developed using PRIMER 3 (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer.html). A total of 10 primer pairs were designed but four failed to amplify a polymerase chain reaction (PCR) product. Characteristics of the remaining six primer pairs are described in Table 1.

The PCRs were performed in a final volume of 12.5 μL [1 × *Taq* polymerase buffer (Promega), 1.2 mM $MgCl_2$, 60 M

© 2005 Blackwell Publishing Ltd

Table 1 Polymorphic repeat microsatellite loci developed for the terrestrial isopod, *Porcellionides pruinosus*

Locus	Primer sequences (5′–3′)	Predicted length (bp)	Repeat in original clone	Annealing temp. (°C)	No. of alleles	Size range (bp)	H_O	H_E
PpT1	F*: AAACGGAAGGAAAGTTGGAC R: ACGAAGCCGCTAATTCTTTG	109	$(GAA)_{10}$	48	9	85–130	0.83	0.5
PpT2	F*: CTTTGTTGGAACATTGCCTTT R: GAATTAGCGGCTTCGTAATTGT	123	$(GA)_{32}$	48	17	109–181	0.89	0.55
PpT3	F*: AATTACGAAGCCGCTAATTC R: CTGAAACGGAAGGAAAGTTG	116	$(CTT)_{10}$	48	10	95–143	0.88	0.72
PpT4	F: ACAAAGAATTAGCGGCTTC R*: ATCTTTGTTGGAACATTGC	131	$(CT)_{31}$	48	15	105–165	0.88	0.63
PpT5	F*: CACAAACAGCCAACCCATTA R: ATGTGATTTGGGCCTTTAGGT	132	$(CA)_5$	48	2	124–126	0.51	0.44
PpT6	F*: TGAATAGGGCTATGCCTGTG R: TCTCGCACCTTAATTTGGTC	151	$(GT)_{22}$	48	6	129–151	0.62	0.4

*Labelled primer.
The predicted length is based on the sequence of the original clone. H_O, proportion of heterozygotes in the sample of 43 individuals; H_E, expected heterozygosity (calculated using GENEPOP version 3.3; Raymond & Rousset 1995). GenBank Accession nos for cloned sequences are AY919067–AY919072.

Table 2 Cross-species amplification using the primers developed for *Porcellionides pruinosus*

	Species				
Locus	*Porcellionides cingendus*	*Armadillidium vulgare*	*Armadillidium nasatum*	*Oniscus asellus*	*Porcellio scaber*
PpT1	M	M	P	—	—
PpT2	—	—	—	—	—
PpT3	—	—	—	—	—
PpT4	—	—	P	—	—
PpT5	—	—	—	—	P
PpT6	—	—	—	—	—

P, polymorphic in the two individuals tested; M, monomorphic; and —, unsuccessful amplification.

each dNTP, 5 pmol each primer, 0.25 U *Taq* polymerase (Promega), and 10 ng of DNA template] using a Trio-Thermoblock (Biometra GmBH). For each reaction, one primer of each pair was end-labelled with one fluorescent phosphoramidite (TET, HEX or 6-FAM). The cycling programme consisted of an initial denaturing step of 5 min at 95 °C, 5 cycles of 1 min at 95 °C, 30 s at specific annealing temperature (Table 1), 1 min at 72 °C followed by 25 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at specific annealing temperature (Table 1), 1 min at 72 °C, and a final step of 5 min at 72 °C. The PCR products were run with the internal size standard GS500-TAMRA on an ABI PRISM 310 automated sequencer. Their size was determined using the GENESCAN software (Applied Biosystems).Table 1 presents details of allelic diversity and heterozygosity estimates at the six loci in three widely separated French populations (Châteaudin, Nevers, and Montamisé with sample sizes of 17, 12, and 14, respectively). The number of alleles per locus ranged from 3 to 17 (average = 9.8) and the observed heterozygosity from 0.24 to 0.96 (average = 0.77), indicating a high level of polymorphism in *P. pruinosus* populations. No significant genotypic linkage disequilibrium was found using Fisher's exact test implemented in GENEPOP version 3.3 (Raymond & Rousset 1995) after Bonferroni correction ($\alpha = 0.05/15 = 0.003$). All the loci were tested for Hardy–Weinberg equilibrium in each population using GENEPOP version 3.3. After sequential Bonferroni correction ($\alpha = 0.05/18 = 0.0028$), only locus *PpT2* showed a deficit of heterozygotes ($P < 0.001$) in the Montamisé population. The variation observed at these microsatellites should help better understand the genetic differentiation in *P. pruinosus* and therefore the role of *Wolbachia* in the genetic polymorphism of this species. We also tested the utility of the primers in five other species of woodlice representing four additional genera. Two individuals from each species were tested at an annealing temperature of 48 °C (Table 2). The conservation of these loci appeared relatively poor among isopod species, although two loci were polymorphic in one other genera.

Acknowledgements

We thank D. Guyonnet for their technical assistance. We are grateful to Maryline Raimond for assistance in collecting the woodlouse samples.

References

Bandi C, Dunn AM, Hurst GDD, Rigaud T (2001) Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in Parasitology*, **17**, 88–94.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, *et al*. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, **86**, 6196–6200.

Marcadé I, Souty-Grosset C, Bouchon D, Rigaud T, Raimond R (1999) Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species. *Heredity*, **83**, 71–78.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP, (version 1.2): populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.

Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R (1999) Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics*, **152**, 1669–1677.

Vandel A (1960) *Faune de France*. *Isopodes Terrestres (Première Partie)*. P. Chevalier, Paris.

Werren JH, O'Neill S (1997) The evolution of heritable symbionts. In: *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction* (eds O'Neill S, Hoffman A, Werren JH). Oxford University Press, New York.

JOURNAL OF CRUSTACEAN BIOLOGY, 27(2): 217–219, 2007

MALE MATING SUCCESS DURING PARTURIAL INTERMOULTS IN THE TERRESTRIAL ISOPOD *ARMADILLIDIUM VULGARE* REVEALED BY THE USE OF A MICROSATELLITE LOCUS

Sébastien Verne, Jérôme Moreau, Yves Caubet, Didier Bouchon, Monique Johnson, and Frédéric Grandjean

(SV, YC, DB, MJ, FG) Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers, 40 Avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France;
(JM) Université de Bourgogne, Equipe Ecologie-Evolution, UMR 5561 Biogéosciences, 6 Bd Gabriel, F-21000 Dijon, France
(corresponding author (FG): frederic.grandjean@univ-poitiers.fr)

ABSTRACT

We investigated the value of microsatellite DNA markers to improve our knowledge of mating strategy with inference to sperm competition in particular, in the woodlouse *Armadillidium vulgare*. In terrestrial isopods, mature females develop a brood pouch or *marsupium* before egg laying, the pouch being formed by overlapping oöstegites during a special moult called parturial moult. Under laboratory conditions, we show that *Armadillidium vulgare* females are able to mate during parturial intermoults, even in the presence of a physical barrier such as that represented by the ventral marsupial plates. Our results reveal that the contribution of a second male mating with a female between two parturial moults could represent up to 50% of the paternal alleles in the brood (mean = 28% ± 15). This contrasts with data reported in the literature concerning closely related woodlice species, where males are suggested not to be able to mate with the female during the parturial intermoult period.

INTRODUCTION

In terrestrial isopods, the reproductive cycle is closely associated with the female moulting cycle (Mead, 1973, 1976). During the sexual rest period, females undergo a normal moult and grow. With the increase in photoperiod and temperature, ovarian maturation begins (Mocquard et al., 1989). Female receptivity in woodlice is higher during the stage where oöcyte maturation is nearly over (Moreau and Rigaud, 2000, 2002), whereas males can mate at any time except during moulting (Moreau and Rigaud, 2000). Fertilisation is internal and isopod females possess two genital apertures each independently linked to one ovary by an oviduct. Males have to perform one insemination in each oviduct in order to fertilize the eggs originating from both ovaries. Sperm is deposited within the oviduct in the form of a large white ball. Sperm is not mobile in woodlice (Hollande and Fain-Maurel, 1965) and is stored in the oviduct until oöcytes are deposited. As far as is known, oöcytes are fertilised when passing through the balls of sperm. After laying, remaining spermatozoon are stored in the spermatheca at the junction between the oviduct and the ovary and will be used to fertilise the next broods (Warburg, 1993). Eggs and embryos are incubated in a marsupium (ventral pouch limited by lamellar structures) that differentiates during the special moult called "parturial moult". Manca emerge from the pouch about five weeks after laying. The marsupium remains until the next moult. This moult generally occurs approximately two weeks later. During this stage, most females cannot mate due to the physical barrier of ventral marsupial plates (Moreau and Rigaud, 2000). The moult following the release of young can be a second parturial moult (eggs will be fertilized by sperm reserve), or a normal moult (growth moult), depending on environmental conditions, such as photoperiod and temperature (Mocquard et al., 1989).

The recent development of very polymorphic molecular markers such as microsatellites in *A. vulgare* (Verne et al., 2006) has provided the opportunity to determine if males are able to mate with females between two parturial moults, and if their sperm can fertilize the eggs. Microsatellites are codominant markers, highly reproductible, and inherited in a Mendelian fashion, which makes them ideal tools to understand mating strategies and to test hypotheses regarding mating behaviour and reproductive systems (Queller et al., 1993).

MATERIALS AND METHODS

Strain Maintenance

The *A. vulgare* individuals used were derived from strains that have been maintained under the same laboratory conditions for many years on moistened soil at 20°C and at the natural photoperiod of Poitiers (latitude 46°40′N). See Moreau et al. (2001) for routine procedure for strain maintenance. For each generation, males and females from the same brood are sorted by sex before they reach sexual maturity. They are then reared separately, thus ensuring that all females are virgin.

Breeding Procedures

At the time of the experiment, females and males were one-year old. To obtain virgin females receptive to mating, females were reared under LD 18:6 photoperiod, which stimulates the onset of reproduction (Mocquard et al., 1989). Female receptivity was assessed by checking the shape of the white plates of calcium carbonate on the ventral surface that differentiate a few days before moulting. Receptive females show incomplete plates whereas their non-receptive counterparts exhibit complete plates (Moreau and Rigaud, 2002). Only females receptive to mating were used.

Each of 15 receptive females was coupled with one male (Origin from Nice, South of France) of approximately equal size (random asymmetry) to avoid the occurrence of reproductive physical incompatibility, and each

Table 1. Parental Allele composition using microsatellite locus Av7 are shown. The allele sizes are given in bp for the locus. For maternal and paternal alleles in offsprings, the numbers of observations are given in parentheses.

Crossing	Mother	Father 1	Father 2	Offsprings
1	286 288	290 290	304 318	286 (9), 288 (11), 290 (10), 304 (4), 318 (6)
2	288 298	290 290	304 318	288 (8), 298 (12), 290 (19), 318 (1)
3	288 298	290 290	304 318	288 (9), 298 (11), 290 (13), 304 (4), 318 (3)
4	286 288	290 290	304 318	286 (12), 288 (8), 290 (15), 304 (2), 318 (3)
5	286 288	290 290	258 304	286 (10), 288 (10), 290 (17), 258 (2), 304 (1)
6	286 298	290 292	304 304	286 (9), 288 (11), 290 (11), 292 (9), 304 (4)
7	288 288	290 290	304 318	288 (20), 290 (16), 304 (2), 318 (2)
8	286 288	290 290	318 318	286 (11), 288 (9), 290 (12), 318 (8)

mating couple was placed in large a box (25 cm) filled with moistened soil at 20°C under natural photoperiodic conditions. Once females had begun to undergo a parturial moult, the male was removed. Females were isolated immediately after their parturial moult in small boxes and maintained under the stimulating photoperiod LD 18:6, again to maintain female reproduction. During this intermoult period, just after the release of offspring, females were coupled with a second male of different origin from that of the first male (Poitiers, West of France), as previously described. The females that underwent a normal moult (as assessed by checking calcium carbonate plates, Moreau and Rigaud, 2002) were removed from the experiment. Females undergoing a second parturial moult were immediately transferred to small boxes in order to isolate and subsequently dissect the young to determine paternity.

Genetic Analysis

Twenty individuals from each brood resulting from the second parturial moult were analysed. DNA was obtained by standard phenol extraction and ethanol precipitation (Kocher et al., 1989) from the muscles, nerve tissue, and gonads of each individual.

The most polymorphic microsatellite, Av7, recently identified by Verne et al. (2006) in *A. vulgare*, was used in the present study to assess paternity. Amplification conditions are detailed in Verne et al. (2006). The genotype of each of the 20 offspring per brood was compared to both the mother's and both putative father's genotypes to identify the maternal and paternal alleles for each locus. The contribution of each father in the siring of offspring was subsequently determined.

Results

Among the 15 females used in this experiment, 8 females underwent a second parturial moult. 5 females underwent a normal moult and were discarded. 2 females died during the experiment. Table 1 gives the allelic composition of both each parent and each offspring.

Of the 8 females that underwent two parturial moults, the second male always participated in the production of offspring. Table 2 gives the relative contribution of each father to the offspring. The contribution of the second male to the offspring, expressed as a percentage, ranges from 5% to 50% (mean = 28% ± 15).

Discussion

In this study, we successfully used a polymorphic microsatellite marker to study the existence of multiple paternity in *A. vulgare*.

Table 2. Male contribution to offspring born from the second parturial moult, expressed as a percentage. Results obtained by genotyping with the microsatellite locus Av7.

	Number of juveniles	Male 1	Male 2
Female 1	20	50	50
Female 2	20	95	5
Female 3	20	65	35
Female 4	20	75	25
Female 5	20	65	35
Female 6	20	85	15
Female 7	20	80	20
Female 8	20	60	40
Mean		72 ± 15	28 ± 15

Firstly, the results reveal that, in *A. vulgare*, males are able to mate with females during parturial intermoults (when oöstegites mask the genital apertures). This confirms the results obtained in the closely related species, *A. nasatum* (Moreau and Rigaud, 2000). This mating possibility is not universal among woodlice due to the presence of a marsupium, which acts as physical barrier to reproduction. Indeed, in other species (*Oniscus asellus*, *Philoscia muscorum*) receptive females with an empty marsupium (after the release of young) are not able to copulate during parturial intermoult (Moreau and Rigaud, 2000).

Secondly, both stored sperm (from the first male) and freshly ejaculated sperm (from the second male) were used by the females to sire their offspring, although the two males did not exhibit the same fertilization success. This confirms previous findings obtained using an albino mutation in this species (Moreau et al., 2002). In this last study, the first male (stored sperm) sired a mean of 72% (± 15) of the female offspring. This fertilization success, however, was not proportional to the number of sperm present. Indeed, the counting of sperm stored in the reserve revealed the presence of very few sperm in comparison with the number observed in fresh ejaculates (Moreau et al., 2002). It is suggested here that sperm position may play an important role in sperm precedence. If this hypothesis is correct, and if indeed fertilization occurs when oöcytes pass through the sperm, then the sperm encountered first may gain a slight advantage. This hypothesis could explain the 'competitiveness' of the stored sperm despite their low numbers, as stored sperm will be encountered by the eggs first during egg laying. Interestingly, the value of sperm precedence observed in the present study differs slightly from that obtained previously (70% here *versus* 50%, Moreau et al., 2002). However, the protocol used in both studies differed slightly. In Moreau et al. (2002), the competition between freshly ejaculated and stored sperm was the same, but the stored sperm was obtained after a period of sexual rest, i.e., remating occurred during two different receptive intermoults. Therefore, the stored sperm was 4 months old. In our study, the stored sperm was younger (only 1 month old) since it was obtained after two successive parturial moults, i.e., remating occurred during the same receptive intermoult. It can therefore be suggested that the duration of storage can affect the viability of spermatozoa under controlled conditions. Further experiments are needed to confirm this hypothesis.

An alternative explanation concerning the difference in pattern of sperm precedence is that the second male

encounters difficulties when attempting to inseminate females with an empty marsupium. Indeed, the presence of oöstegites in front of the genital apertures in receptive females makes mating more difficult. As a result, the second male may deposit less sperm in the genital duct than a male mating with a female without marsupium. A sperm count is necessary to answer this question.

In this study, 100% of the males inseminated a female. This result is higher than has been observed in *Armadillidium nasatum*, where only 41% of males inseminated females with an empty marsupium while 90% of males inseminate a female without a marsupium.

This work reveals that the microsatellites isolated from *A. vulgare* may reveal themselves to be very useful in the study of sexual selection intensity and sperm competition in this species. This species harbours an alpha-proteobacteria, *Wolbachia*, which induces the feminization of genetic males, termed neo-females. Recently, Moreau et al. (2001) reported that males had a preference for real females during mating. Further investigations will be undertaken to investigate paternity patterns in both the real and neo-females.

References

Hollande, A., and M. A. Fain-Maurel. 1965. Nouvelles observations sur l'infrastructure du spermatozoïde des isopodes Origine et évolution de la vésicule spermatique d'*Armadillidium vulgare*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Série III 265: 787-789.

Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primer. Proceedings of National Academic Science of USA 86: 6196-2000.

Mead, F. 1976. La place de l'accouplement dans le cycle de reproduction des isopodes terrestres (Oniscidea). Crustaceana 31: 27-41.

———. 1973. Recherches sur la reproduction et le comportement sexuel des Isopodes terrestres. Ph.D. dissertation. Univ de Provence, France.

Mocquard, J. P., P. Juchault, and C. Souty-Grosset. 1989. The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). Monitore Zoologico Italiano Monographia 4: 455-475.

Moreau, J., and T. Rigaud. 2000. Operational sex ratio in terrestrial isopods: interaction between potential rate of reproduction and *Wolbachia*-induced sex ratio distortion. Oikos 92: 477-484.

———, and ———. 2002. Calcium carbonate deposits shape as external marker for female reproductive status in terrestrial isopods. Journal of Crustacean Biology 22: 677-681.

———, A. Bertin, Y. Caubet, and T. Rigaud. 2001. Sexual selection in an isopod with *Wolbachia*-induced sex reversal: males prefer real females. Journal of Evolutionary Biology 14: 388-394.

———, S. Seguin, Y. Caubet, and T. Rigaud. 2002. Female re-mating pattern differs after recent and ancient copulation in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. Animal Behaviour 64: 569-577.

Quellar, D. C., J. E. Strassman, and C. R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. Trends in Ecology and Evolution 8: 285-288.

Verne, S., N. Puillandre, G. Brunet, N. Gouin, P. B. Samollow, J. D. Anderson, and F. Grandjean. 2006. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Molecular Ecology Notes 6: 328-330.

Warburg, M. R. 1993. Evolutionary Biology of Land Isopods. Springer-Verlag, Berlin.

Received: 23 April 2006.
Accepted: 16 October 2006.

 doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01220.x

PRIMER NOTE

Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*

SÉBASTIEN VERNE,* NICOLAS PUILLANDRE,* GÉRALDINE BRUNET,* NICOLAS GOUIN,† PAUL B. SAMOLLOW,‡ JOEL D. ANDERSON† and FRÉDÉRIC GRANDJEAN*

*Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers, 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France, †Department of Genetics, Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX 78245-0549, USA, ‡Department of Veterinary Integrative Bioscience, Texas A&M University, College Station, TX 77843-4458, USA

Abstract

The common pill bug, *Armadillidium vulgare*, is known to harbour two distinct strains of the feminizing proteobacteria *Wolbachia*. In order to study the effect of the presence of *Wolbachia* on the evolution of *A. vulgare* populations, we developed and characterized a set of nine polymorphic microsatellite loci from two microsatellite-enriched genomic libraries. We screened 48 individuals from three French populations and found high genetic variation. Locus-specific allelic diversity ranged from four to 28 and observed heterozygosity from 0.40 to 1.00, which indicates that these markers can be used to conduct population genetic studies in *A. vulgare*.

Keywords: *Armadillidium vulgare*, Crustacea, Isopoda, microsatellites

Received 7 September 2005; revision accepted 20 October 2005

The common pill bug, *Armadillidium vulgare* (Crustacean, Isopod), is known to harbour two distantly related *Wolbachia* strains (Cordaux *et al*. 2004). *Wolbachia* are intracytoplasmic α-proteobacteria that modify the reproduction of their hosts. Both strains induce feminization of genetic males into functional females in *A. vulgare*. Changes in host reproduction caused by *Wolbachia* can enhance the spread of the symbiont in infected populations (Werren & O'Neill 1997) by increasing the frequency of infected cytoplasm at the expense of uninfected cytoplasm and by causing a decrease in mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism. However, the situation in *A. vulgare* is more complex because an unidentified non-Mendelian genetic element, called *f*, acts as a third feminizing sex-ratio distorter (Legrand & Juchault 1984). Moreover, at least one 'resistance' gene inhibits vertical transmission of *Wolbachia* (Rigaud & Juchault 1992) and one 'masculinizing' gene restores male phenotype in the presence of *f* or *Wolbachia* (Rigaud & Juchault 1993). As a consequence, *Wolbachia* infection does not spread. This can explain the presence of increased mtDNA polymorphism in infected *A. vulgare* populations compared to other infected isopod species (Rigaud *et al*. 1999). Although the host–parasite model *A. vulgare*/*Wolbachia* has been studied for a long time, very little is known about the dispersal capabilities of *A. vulgare* and *Wolbachia* in the wild. To provide tools for examining the genetic structure of natural *A. vulgare* populations and the role of the feminizing factors on their genetic polymorphisms, we have isolated and characterized nine microsatellite loci for this species.

Isolation of microsatellite markers was achieved by the method of Hamilton *et al*. (1999). A detailed protocol is available at http://bioserver.georgetown.edu/faculty/hamilton/. Briefly, total genomic DNA was extracted by a phenol–chloroform protocol (Kocher *et al*. 1989) from ovaries of one *A. vulgare* (*Wolbachia* non-infected) from a captive population. Twenty-five micrograms of genomic DNA was digested with restriction endonucleases *Hae*III, *Rsa*I, *Alu*I and *Nhe*I (New England Biolabs) to generate DNA fragments within the 200–1000 bp range. These fragments were dephosphorylated using calf intestinal alkaline phosphatase and ligated to SNX linkers (SNX: 5′-CTAAGGCCTTGCTAGCAGAAGC-3′; SNX reverse: 5′-pGCTTCTGCTAGCAAGGCCTTAGAAAA-3′). Two equal volumes of the linker-ligated genomic DNA solution (10 μL) were then probed respectively with biotin-labelled $(AC)_{15}$ and $(AG)_{15}$ oligonucleotides. Library enrichment was achieved by a magnetic separation protocol employing

Correspondence: Sébastien Verne, Fax: +33 5494540 15; E-mail: sebastien.verne@free.fr

© 2006 Blackwell Publishing Ltd

streptavidin-coated polystyrene beads (Dynabeads M-280; Dynal, Inc.). The (AC)-enriched and the (AG)-enriched microsatellite libraries were constructed by cutting the enriched fragments with *Nhe*I, ligating the resulting products into dephosphorylated *Xba*I-digested pBluescript plasmid, and transforming the ligated plasmids into Epicurian Coli XL2-Blue MRF Ultracompetent cells (Stratagene). Plasmid DNA was isolated using the QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN). Each library was screened with the same probe used for the bead enrichment protocol using a chemiluminescent detection kit (New England Biolabs). A total of 43 positive clones were sequenced using T3/T7 primers and BigDye termination mix (PerkinElmer Applied Biosystems) and resolved on an ABI 377 automated DNA analyser (Applied Biosystems). Sequences containing microsatellites were aligned using SEQUENCHER software (Gene Codes Corporation) to identify duplicate clones. Polymerase chain reaction (PCR) primer sets for amplification of the 43 cloned microsatellites were designed with PRIMER 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

PCRs were performed in a final volume of 12.5 µL [1× *Taq* polymerase buffer (Promega: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100 and 15 mM $MgCl_2$; except 1× TaKaRa buffer II for Av7: 100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol), 1.2 mM $MgCl_2$, 60 M of each dNTP, 5 pmol of each primer, 0.25 U *Taq* polymerase (Promega, except LA *Taq* from TaKaRa for Av7) and 10 ng of DNA template] using a Trio-Thermoblock (Biometra GmBH). For each reaction, one primer of each pair was end labelled with one fluorescent phosphoramidite (TET, HEX or 6-FAM). The cycling programme consisted of an initial denaturing step of 5 min at 95 °C, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at specific annealing temperature (Table 1), and 45 s at 72 °C followed by a final step of 10 min at 72 °C. PCR products were separated along with the internal size standard GS500-TAMRA on an ABI PRISM 310 automated sequencer. Product sizes were determined using the GENESCAN software (Applied Biosystems).

Nine polymorphic microsatellites were optimized. Table 1 presents details of allelic diversity and heterozygosity

Table 1 Polymorphic repeat microsatellite loci developed for the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*

Locus (GenBank Accession no.)	Primer sequences (5′–3′)	Repeat in original clone	Annealing temp. (°C)	No. of alleles	Size range (bp)	Pop.	H_O	H_E
Av1	F(1): TGGAGTCAACTCACATTCTG	$(CA)_{10}$	56	4	108–114	Ens.	0.53	0.68
DQ234304	R: TGTCTGTAAAACTTGTGCTACG					Poi.	0.53	0.45
						Montp.	0.40	0.58
Av2	F(1): TGAAGTTCGGGTGAATTGTG	$(CA)_9(CG)_3(CA)_2$	56	4	159–165	Ens.	0.79	0.69
DQ234305	R: ATACCATGACGTGTCGCAAG					Poi.	0.89	0.65
						Montp.	0.60	0.75
Av3	F(2): TGAGTCTCATTATAGTTTGGATGA	$(CA)_4(CG)_2(CA)_{11}$	48	13	185–233	Ens.	0.69	0.83
DQ234306	R: TCCTCTCTATACCCCATAATTTCA					Poi.	0.65	0.68
						Montp.	0.88	0.89
Av4	F(1): CCGAACCTTTCGAAGGTATT	$(GT)_4AT(GT)_{19}$	56	16	198–242	Ens.	0.45	0.79
DQ234307	R: AAGGCACATAACATTTTCACAAA	$(GA)_4AA(GA)_{11}$				Poi.	0.73	0.82
						Montp.	0.90	0.79
Av5	F(1): CGTGCGAAGTTCAGATTCTTT	$(CA)_{13}$	56	28	286–396	Ens.	1.00	0.94
DQ234308	R: GCGCGCTCGAGGATTTAC					Poi.	0.95	0.92
						Montp.	0.88	0.94
Av6	F(1): GGAATGAGGTCGTCGACTATG	$(GT)_8AT(GT)_2$	56	5	166–178	Ens.	0.74	0.56
DQ234309	R: GTCTTTCAAACGGGCACAAT					Poi.	0.63	0.55
						Montp.	0.44	0.53
Av7	F: TCATTTCCGCTTTCCTCATT	$(GT)_2(GC)_7(GT)_{11}$	50	8	229–251	Ens.	0.50	0.74
DQ234310	R(3): CCAACCCTGATTATGGTCTGAT					Poi.	0.40	0.63
						Montp.	0.60	0.71
Av8	F(2): CAACATCCTAATATTCAGTTCTCA	$(CA)_{32}$	48	15	152–192	Ens.	0.74	0.79
DQ234311	R: AGTTTACAGAATACGGCTGAGG					Poi.	0.68	0.84
						Montp.	0.70	0.84
Av9	F(1): TCTCGAAGAATTGCCTCACA	$(CA)_{16}$	56	14	175–221	Ens.	0.88	0.84
DQ234312	R: CGATGACTGGGACAATCTCA					Poi.	0.84	0.87
						Montp.	1.00	0.89

Label used and labelled primer: (1) 6-FAM. (2) HEX (3) TET.
Pop., population's name; Ens., Ensoulesse; Poi., Poitiers; Montp., Montpellier; H_O, proportion of heterozygotes; H_E, expected heterozygosity (calculated with GENEPOP version 3.3; Raymond & Rousset 1995). Forty-eight individuals were amplified for each locus.

Table 2 Allele sizes obtained by cross-species amplification using the primers developed for *Armadillidium vulgare*

	Species				
Locus	*Armadillidium nasatum*	*Armadillidium maculatum*	*Oniscus asellus*	*Porcellio scaber*	*Porcellionides pruinosus*
Av1	—	—	—	—	—
Av2	—	145	—	—	—
Av3	217	177–179	—	—	—
Av4	—	—	—	—	—
Av5	374–386–410	304–306	—	—	—
Av6	174	164	—	—	—
Av7	—	—	—	—	—
Av8	136–144	122–124–130	—	—	—
Av9	—	—	—	—	—

estimates at these nine loci in three widely separated French populations (Poitiers, Ensoulesse and Montpellier with sample sizes of 19, 19 and 10 respectively). The number of alleles per locus ranged from four to 28 (average = 11.9) and the observed heterozygosity from 0.40 to 1.00 (average = 0.75), indicating a high level of polymorphism in *A. vulgare* populations. No significant genotypic linkage disequilibrium was found using Fisher's exact tests implemented in GENEPOP version 3.3 (Raymond & Rousset 1995) after sequential Bonferroni correction ($\alpha = 0.05$, $k = 36$). All the loci were tested separately in each population for Hardy–Weinberg equilibrium using GENEPOP version 3.3. No significant disequilibrium was detected after sequential Bonferroni correction ($\alpha = 0.05$, $k = 27$). We also tested the utility of the primers in five other species representing three additional genera (Table 2). Two individuals from each species were tested at an annealing temperature of 48 °C. Some loci (Av3, Av5, Av6 and Av8) amplified successfully and exhibited polymorphisms in *Armadillidium* species, but none amplified in other species tested.

The polymorphisms observed at the nine microsatellite loci described herein should facilitate better understanding of genetic differentiation and structure among populations of *A. vulgare* and the evolutionary impact of sex-ratio distorters like *Wolbachia* on this species.

Acknowledgements

We thank Sylvie Patri for her technical assistance. We are grateful to Maryline Raimond, Catherine Debenest and Marie-Cécile Throuillé for assistance with collecting the woodlouse samples. The PhD work of Sébastien Verne is supported by a doctoral fellowship from the Région Poitou-Charentes.

References

Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity*, **93**, 78–84.

Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, **27**, 500–507.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 6196–6200.

Legrand JJ, Juchault P (1984) Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie chez le crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics, Selection, Evolution*, **16**, 57–84.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.

Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R (1999) Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics*, **152**, 1669–1677.

Rigaud T, Juchault P (1992) Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity*, **68**, 47–52.

Rigaud T, Juchault P (1993) Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics*, **133**, 247–252.

Werren JH, O'Neill S (1997) The evolution of heritable symbionts. In: *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction* (eds O'Neill S, Hoffman A, Werren JH), pp. 125–154. Oxford University Press, Oxford.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Gene 397 (2007) 58 – 66
GENE
www.elsevier.com/locate/gene

Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*

Sébastien Verne *, Monique Johnson, Didier Bouchon, Frédéric Grandjean

Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés, UMR CNRS 6556, Université de Poitiers, 40, avenue du Recteur Pineau, F-86022 Poitiers Cedex, France

Received 20 December 2006; received in revised form 4 April 2007; accepted 4 April 2007
Available online 14 April 2007
Received by M. Di Giulio

Abstract

Wolbachia are maternally inherited endosymbiotic α-Proteobacteria infecting a wide range of arthropods. *Wolbachia* induce feminization in many terrestrial isopod species, particularly in the genus *Armadillidium* (Crustacea, Oniscidea). The diversity of *Wolbachia* strains infecting *Armadillidium* species was examined. Results reveal that natural populations of *A. vulgare* contain three different *Wolbachia* strains (*w*VulC, *w*VulM and *w*VulP). The *wsp* gene and its 3′-adjacent region show evidence that two recombination events have occurred between two of these strains. In both cases, multiple statistical analyses suggest that a small gene fragment of a strain closely related to *w*VulM (minor parent) is inserted into the genome of another strain closely related to *w*VulC (major parent). Although multiple infections in a single individual have never been demonstrated in natural population, the existence of recombination between feminizing strains suggests that bi-infections are possible, or at least that bi-infections can be maintained sufficiently long enough to allow recombination. Recombination events increase genetic diversity of *Wolbachia* found in *Armadillidium* species and may play a role in the ability of *Wolbachia* strains to invade new hosts.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Endosymbiosis; *wsp*; Genome plasticity; Feminization

1. Introduction

Wolbachia are maternally inherited endosymbiotic α-Proteobacteria infecting a wide range of nematodes and arthropods (O'neill et al., 1992, Stouthamer et al., 1999). Depending on both the bacterial lineage and host, they may have very diverse effects on host reproduction, such as cytoplasmic incompatibility (CI), male killing, parthenogenetic reproduction or feminization of genetic males (Rigaud, 1999, Stouthamer et al., 1999). In terrestrial isopod species (Crustacea, Oniscidea), *Wolbachia* induce CI in two species, *Porcellio dilatatus petiti* and *Cylisticus convexus* (Legrand and Juchault, 1986, Moret et al., 2001) and feminization in many others, including members of the genus *Armadillidium*, such *as A. vulgare* and *A. nasatum* (Bouchon et al., 1998, Rigaud et al., 1991). Feminization occurs through conversion of genetic males into functional females, which typically produce female-biased progenies (Rigaud et al., 1997). Recently, based on *wsp* gene sequences, two distinct feminizing *Wolbachia* strains have been found in various populations of *A. vulgare* (Cordaux et al., 2004). The comparison of bacterial strains and their respective host mitochondrial phylogenies showed no concordance, indicating horizontal transmission of the *Wolbachia* strains within populations of *A. vulgare*. *A. vulgare* is to date the only known species of terrestrial isopod to host more than one *Wolbachia* strain (Bouchon et al., 1998). Despite extensive sampling efforts, no multiple infections in single individuals of isopod species have been so far recorded. This suggests that feminization establishes a high competition between *Wolbachia* and/or that multi-infection is unstable in these species. Since no multiple infections have been discovered in isopod species, recombination within and between *Wolbachia* strains is basically unexpected. However, Baldo et al. (2005a) have shown evidence

Abbreviations: bp, base pair; CI, cytoplasmic incompatibility; HVR, hypervariable region; MLST, multilocus sequence typing

* Corresponding author. Tel.: +33 5 49 36 62 46; fax: +33 5 49 45 40 15.
E-mail address: sebastien.verne@etu.univ-poitiers.fr (S. Verne).

0378-1119/$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.gene.2007.04.006

for recombination in some *Wolbachia* strains of isopods. The evolutionary context of these recombination events is difficult to understand as horizontal transfers would be rare events between some of the involved host species as they live in different habitats.

The first example of recombination was described between two *Wolbachia* strains (belonging to the supergroup B) of a parasitoid wasp and its fly host (Werren and Bartos, 2001). Since then, a growing number of publications have revealed other recombination events within *Wolbachia* chromosomal genes, a large number of which involve *wsp* (Baldo et al., 2005a,b, Jiggins, 2002, Jiggins et al., 2001, Keller et al., 2004, Malloch and Fenton, 2005, Reuter and Keller, 2003, Werren and Bartos, 2001). Recombination can also occur between highly divergent strains belonging to different supergroups (Baldo et al., 2005a,b, Jiggins, 2002, Malloch and Fenton, 2005). Therefore recombination may be common in *Wolbachia* and may confuse phylogenetic relationship reconstructions based on a single gene. Moreover, several studies in different insect species specify lateral transfer of the phage WO-B between co-infecting *Wolbachia* strains (Bordenstein and Wernegreen, 2004, Masui et al., 2000) and intragenic recombination may be common in extra-chromosomal DNA, including phage and transposable elements (Bordenstein and Wernegreen, 2004, Duron et al., 2005).

For lateral DNA transfers that are not phage-mediated, bacteria must come into close contact (Jiggins, 2002). As *Wolbachia* are vertically transmitted endosymbionts, opportunities for recombination between different types would appear to be restricted except in the case of multiple infections.

In this paper we wish to test the occurrence of genetic exchange between feminizing *Wolbachia* strains. To address this issue we analyzed *Wolbachia* polymorphism within three host species belonging to the *Armadilllidium* genus. Results strongly suggest two independent recombination events between the two *Wolbachia* strains (*w*VulC and *w*VulM) infecting sympatric *Armadillidium* species. The origin and evolutionary implications of recombination events and horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* strains are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and sequencing

Three populations of *A. vulgare* (originating from Poitiers, Ensoulesse and Chizé) and a population of *A. nasatum* (originating from Frelinghien) were sampled in France (Table 1). The population of Poitiers was sampled in 2003 and in 2006. The infection status of each specimen was assessed by PCR assay of the *Wolbachia wsp* gene as described below. Additionally, one infected female of *A. album* collected at Yves (France) for which the *Wolbachia* strain has previously been identified (Bouchon et al., 1998) was included in this study. This strain will be denoted *w*Album to avoid confusion with the strain infecting *Aedes albopictus* (called wAlb, according to the nomenclature of Zhou et al. (1998)).

DNA extraction, PCR amplification and sequencing of the *wsp* region from all infected individuals were performed as described in Michel-Salzat et al. (2001). To infer the size of the recombinant fragments, the 3′ adjacent region of the *wsp* gene was sequenced. PCR amplifications were performed using *wsp* 81F primer (Braig et al., 1998) and a primer RPOHR (5′-TTAAHCCYATRTTWCCTTC-3′) designed inside the heat shock σ-factor *rpoH* gene which is located downstream of the *wsp* gene in the *w*Mel genome (Wu et al., 2004). PCR cycling conditions were: 95 °C for 2 min; 38 cycles at 95 °C for 1 min, 45 °C for 1 min, 72 °C for 1 min 40 s; 72 °C for 5 min; then held at 4 °C. PCR products were purified using QiaQuick PCR purification kits (Qiagen). Sequencing was performed using a BigDye v3.1 terminator sequencing kit and an ABI 3130 Genetic Analyzer. By using primers *wsp* 81F, *wsp* 691R (Braig et al., 1998), RPOHR and an internal forward primer 411F (5′-AAATCAAACTTTACGCTGGCG-3′), we obtained complete sequences of 1136 to 1146 bp, depending on the *Wolbachia* strains. These sequences comprise 606 to 615 bp of the 3′ end of the *wsp* gene, 296 to 297 bp of a non-coding intergenic region and 234 bp of the 5′-region of the heat shock σ-factor *rpoH* gene. In order to measure the range of recombination, we also sequenced six other *Wolbachia* genes, namely *groE* operon that includes a non-coding intergenic region together with *groES* and *groEL* (with primers groEF1 5′-GAAGAAAAACAAGGTG-GAATT-3′ and groER1 5′-GTACCATCACCAACTTTGTC-3′; D. Bouchon, pers. com.) and 5 genes widely distributed across the *Wolbachia* genome and used in one of the two available multilocus sequence typing approaches (Baldo et al., 2006; Paraskevopoulos et al., 2006): *ftsZ* (with primers ftsZf1 and ftsZr1, Werren et al., 1995), *gatB*, *coxA*, *hcpA* and *fbpA*. PCR conditions and sequencing reactions were performed as those described by Baldo et al. (2006). All sequences were deposited in GenBank–EMBL databases under the accession numbers DQ778095–DQ778107 and EF451545–EF451564 (Table 2).

Table 1
Wolbachia prevalence in the sampled populations of three *Armadillidium* species

Sampled locality	Sample year	*N*, ♂/♀	Number of infected females:				
			*w*VulM	*w*VulC	*w*VulP	*w*Nas	*w*Album
Armadillidium vulgare							
Ensoulesse	2003	10/9	1		1		
Poitiers	2003	10/8	1	3	4		
Poitiers	2006	5/14	1		9		
Chizé Biological Reserve	2003	5/14	3	5			
Armadillidium nasatum							
Frelinghien	2006	5/22				6	
Mignaloux [a]	1993	0/19				4	
Amou [a]	1995	3/3				1	
Armadillidium album							
Yves	1994	1/7					6

[a] Samples from Bouchon et al. (1998).

2.2. Evolutionary analyses

All sequences were manually aligned taking into account their amino acid translation. Sequences of *wsp* and *groE* were

Table 2
List of *Wolbachia wsp*, *ftsZ* and *groE* sequences drawn from GenBank or newly sequenced which where used for phylogenetic analysis

		wsp	*ftsZ*	*groE*
Isopod strains	*Armadillidium vulgare w*VulC	DQ778095 [a] AJ419986 [b] AJ419987 [b]	DQ778100 [a] AJ223244 [c]	DQ778103 [a]
	*Armadillidium vulgare w*VulM	DQ778097 [a] AJ419984 [b] AJ419985 [b]	DQ778101 [a]	DQ778104 [a]
	*Armadillidium vulgare w*VulP	DQ778096 [a] AJ269474 [d]	DQ778102 [a]	DQ778105 [a]
	*Armadillidium nasatum w*Nas	DQ778098 [a] AJ276600 [e]	AJ223244 [c]	DQ778106 [a]
	*Armadillidium album w*Album	DQ778099 [a] AJ276599 [e]	AJ223245 [c]	DQ778107 [a]
Other strains	*Acraea alcinoe*	AJ271196		AJ318483
	Acraea encedon	AJ130716		AJ318482
	Acraea eponina	AJ271194		AJ318486
	Aedes albopictus	AY462863		AJ511281
	Aedes pseudalbopictus	AF317487		AJ511282
	Asobara tabida	AY581193, AF124856		AY578349, AJ634749
	Culex (Eumelanomyia) sp.	AF317480		AJ511283
	Culex brevipalpis	AF317477		AJ511290
	Culex fuscocephala	AF317481		AJ511284
	Drosophila melanogaster	NC_002978		NC_002978
	Drosophila ananassae	AY858801		NZ_AAGB01000065
	Elenchus japonicus	AB039281		AB039281
	Ephestia kuehniella	AF071911		AB002290
	Hypolimnas bolina bolina	AB085181		AB167350
	Laodelphax striatella	AB039042		AB039040
	Leptopilina heterotoma	AF124860		AJ634748
	Sogatella furcifera	AF481185		AB039041
	Teleogryllus taiwanemma	AB035514		AB002286
	Tripteroides aranoides	AY462857		AJ511293

No differences were observed between sequences obtained from isopod species and the previously published corresponding sequences.
[a] This study.
[b] Cordaux et al. (2004).
[c] Bouchon et al. (1998).
[d] Schulenburg et al. (2000).
[e] Cordaux et al. (2001).

aligned with sequences from 20 A- and B-*Wolbachia* strains downloaded from GenBank (listed in Table 2). In the phylogenetic analyses, the 4th hypervariable region of *wsp* (Baldo et al., 2005a; positions 500–569 of *w*VulC sequence) was removed from the alignment because the most divergent sequences could not be aligned with confidence in this region. Neighbor-joining analyses were conducted using MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) based on Kimura two-parameter distances. Bootstrap analyses were carried out with 1000 replicates.

Analysis of recombination was done using the whole sequenced part of the *wsp* gene (from 606 to 615 bp according to the strains), the 4th HVR and 3′-adjacent region (from 530 to 531 bp) included, leading to a total length of 1155 bp. The 4th HVR was included as it was possible to align the sequences of the five studied strains with confidence in this region. In order to increase the power of detection and minimize false positive inference (Posada, 2002), we used four recombination detection methods implemented in the RDP software package (Martin and Rybicki, 2000): RDP, Bootscanning (Salminen et al., 1995), Chimaera (Maynard Smith, 1992, Posada and Crandall, 2001) and SiScan (Gibbs et al., 2000). All methods were used with default parameters except Bootscanning (scan parameters: window size = 200; step size = 15). We also used the recombination analyses provided in DNASP v. 4 (Rozas et al., 2003), which calculates the minimum number of recombination events, ρ_M, according to Hudson and Kaplan (1985). DNASP was also used to locate the sites where putative recombination events have taken place. To test the possibility of intragenomic recombination, the recombinant fragments were independently analyzed using BLAST against *Wolbachia* genomes already accessible: *w*Mel from *Drosophila melanogaster* (Wu et al., 2004), *w*Bm from *Brugia malayi* (Foster et al., 2005), *w*Ana from *D. annanassae* (Salzberg et al., 2005) and *w*Pip from *Culex quinquefasciatus* on the Sanger website (http://www.sanger.ac.uk/Projects/W_pipientis/).

3. Results

3.1. Wolbachia strains polymorphism

Infection statuses of sampled specimens are summarized in Table 1. The *wsp* sequences were obtained from 29 *Wolbachia*-

infected females of *A. vulgare*. Based on the *wsp* sequences, three different strains were observed, the two previously described strains, namely *w*VulC and *w*VulM (Cordaux et al., 2004), and a new one, named *w*VulP (for *Wolbachia A. vulgare* type Poitiers). The strains *w*VulC, *w*VulM and *w*VulP were observed to infect eight females, six females and fourteen females of the whole sample, respectively (Table 1). Eleven females of *A. nasatum* were infected by the same *w*Nas *Wolbachia* strain whose *wsp* sequence was identical to that previously published (Cordaux et al., 2001). Each infected female harboured a single *Wolbachia* strain, as shown by the direct sequencing of the purified PCR products, which revealed no ambiguity or discrepancy within or between the analyzed strands of each *wsp* sequence.

groE gene was sequenced in all infected females. Three different sequences were found in *groE* sequences occurring in (i) *w*Album and *w*VulM, (ii) *w*VulC and *w*VulP and (iii) *w*Nas. The *w*Nas sequence differed by only one substitution from *w*VulC and *w*VulP sequences. *w*Album and *w*VulM differed only by 6 substitutions from *w*VulC and *w*VulP sequences (Fig. 1). Multi locus genes show low polymorphism: *ftsZ*, *coxA* and *gatB* show no polymorphism between analyzed strains whereas *hcpA* shows a distinct allele in *w*VulM (one single substitution) and *fbpA* shows a distinct allele in *w*Album (six substitutions). This low polymorphism confirms the close relationship of *w*VulC, *w*VulP and *w*Nas. As observed on *wsp* sequences, direct sequencing of the purified PCR products of all these genes revealed no ambiguity or discrepancy suggesting the absence of multiple infections in a single individual.

3.2. Recombination analysis

Alignments of the *wsp* sequences and their adjacent 3′-regions suggest two recombination events with four breakpoints (Fig. 2 and Table 3). The first recombinant fragment is detected with the highest probabilities in the *w*VulP strain by four of the methods: RDP ($P<10^{-6}$), Bootscanning ($P<10^{-6}$), Chimaera ($P<10^{-4}$) and Siscan ($P<10^{-4}$). Major and minor parents are respectively identified as *w*VulC and *w*VulM. The size of the recombinant fragment is 61 bp located in the 4th HVR of *wsp* (1st breakpoint between positions 495 and 505 and second breakpoint between positions 564 and 599). In the 3′end of the *wsp* sequence (504 base pairs), *w*VulP is more closely related to *w*VulC than to *w*VulM (99.8% and 90.2% identity, respectively). In the last 576 bases (non-coding region and *rpoH* 5′ end) *w*VulP is also more closely related to *w*VulC than to *w*VulM (99.3% and 97.0% identity respectively). On the contrary, in the recombinant region (61 bp), *w*VulP is closely related to *w*VulM and more distantly related to *w*VulC (88.8% and 50.6% identity respectively; Fig. 2). In the 3′ end of the *wsp* sequence (504 base pairs), only one non-synonymous substitution is found at position 433 of the nucleotide sequence (position 144 of the

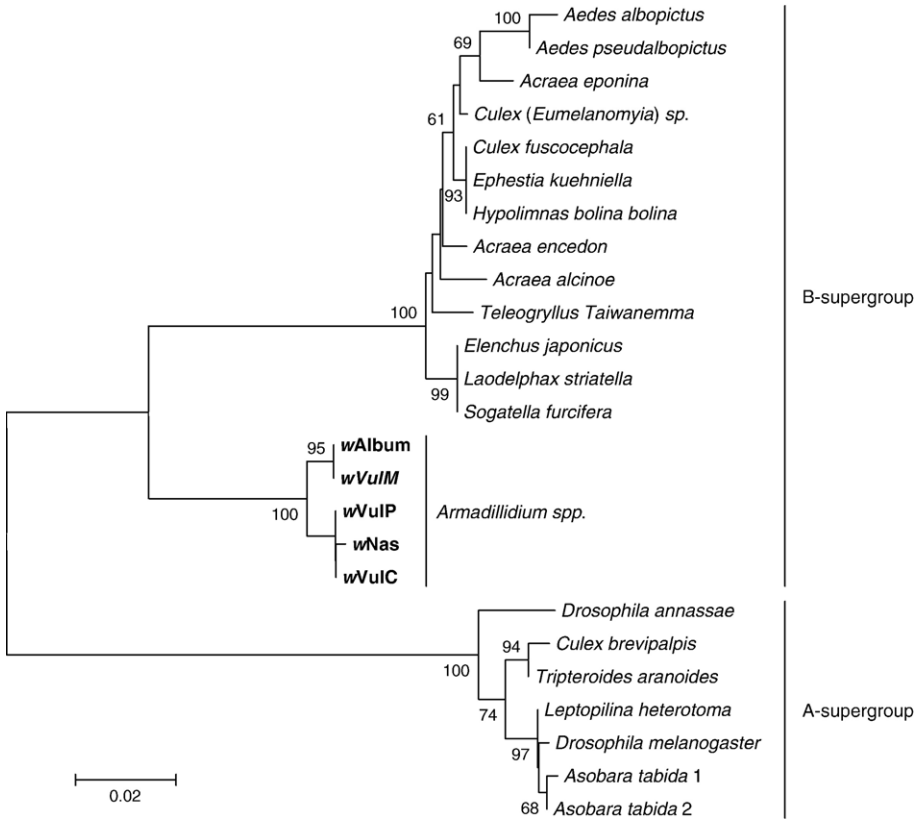


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Wolbachia* strains based on *groE*. The tree is based on the comparison of 528 bases of the *groE* gene, using the neighbor-joining method. Numbers at the nodes are bootstrap scores. Only values higher than 50 are shown. Strains are identified by the host from which they were isolated. The five *Wolbachia* strains from *Armadillidium* species (*w*VulC, *w*VulM, *w*VulP, *w*Nas and *w*Album) are shown in bold. Accession numbers of *groE* sequences from other arthropod symbionts are listed in Table 2.

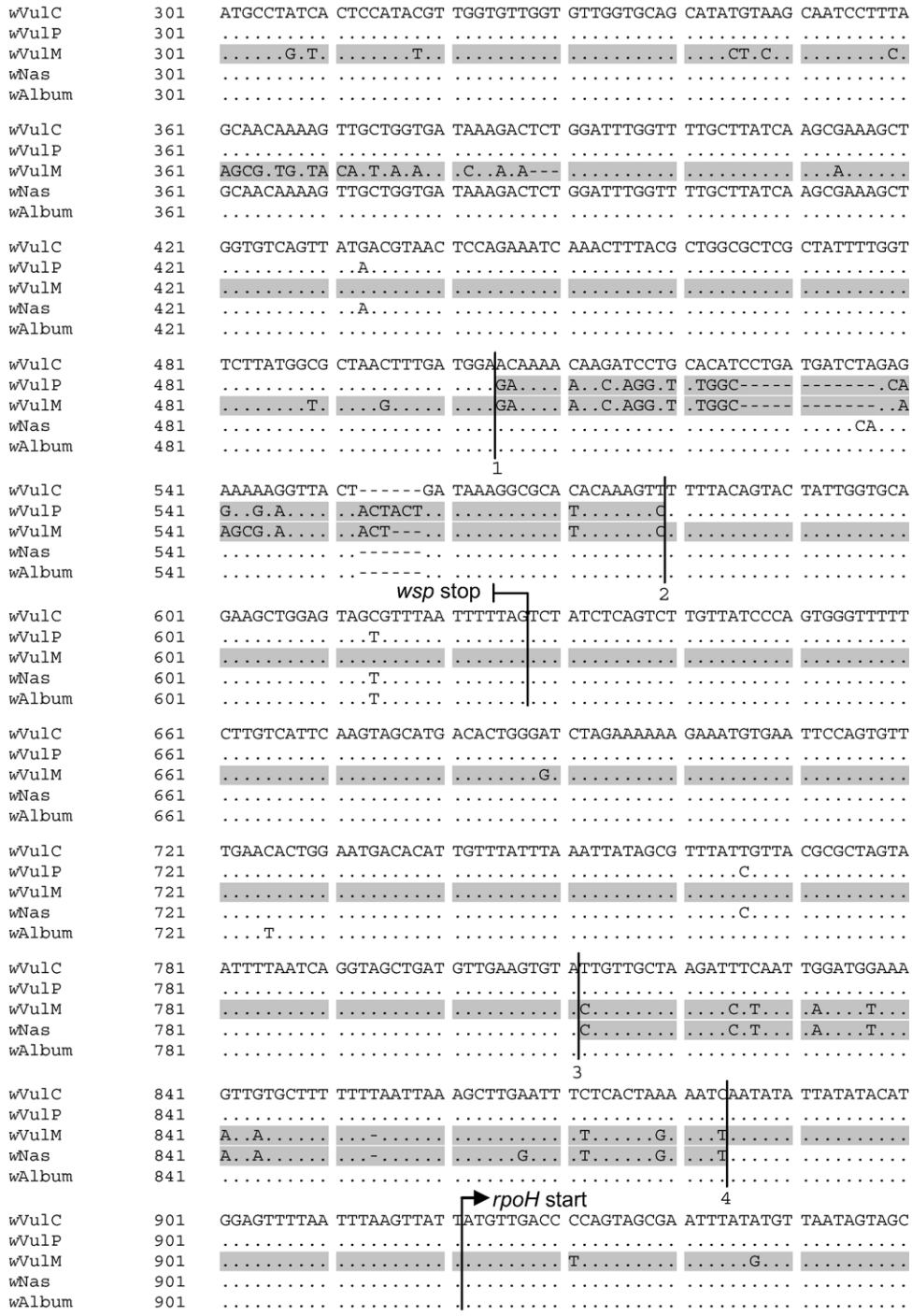


Fig. 2. Nucleic partial sequences of *wsp* gene and its 3′-adjacent region of the five *Wolbachia* strains sequenced in *Armadillidium* genus (only positions 301 to 960 of the alignment are shown). 1st position of the alignment corresponds to the 106th position of *wsp* gene. Codon stop is located at position 625. Heat shock σ-factor *rpoH* locus starts at position 922. Numbers under sequence alignments correspond to breakpoints identified with DNAsp.

protein sequence, aspartic acid in *w*VulC and asparagine in *w*VulP, see Fig. 3). Within the recombinant region, the observed divergence leads to 10 amino acid changes when compared to the *w*VulC protein sequence (excluding indels; Fig. 3). No stop codon or frame shift was found in this region.

The second recombinant fragment was found in the *w*Nas sequence by three of the methods used with lower probabilities than those of the recombinant fragment identified in *w*VulP: Bootscanning ($P<10^{-7}$), Chimaera ($P<10^{-2}$) and Siscan ($P<10^{-3}$). This recombination event was not detected by the RDP method. Major and minor parents were respectively identified as *w*VulC and *w*VulM. The size of the recombinant fragment is 70 bp (1st breakpoint between positions 766 and 812 and second breakpoint between positions 884 and 931) located in the intergenic region between *wsp* and *rpoH* (see Fig. 2 and Table 3). Excluding indels, *w*Nas is more closely

Table 3
Summary of recombination analysis results using 4 methods implemented in the RDP software package: RDP, Bootscan, Chimaera and Siscan

Daughter	Major parent	Minor parent	Region	Minimum size (bp)	Method	*P*-value
*w*VulP	*w*VulC	*w*VulM	502–564 (505–579)	61	RDP	3.380E−7
					BootScan	3.422E−7
					Chimaera	1.360E−5
					Siscan	1.059E−5
*w*Nas	*w*VulC	*w*VulM	803–874 (812–884)	70	RDP	–
					BootScan	1.008E−8
					Chimaera	9.607E−3
					Siscan	9.991E−4

Beginning and ending breakpoint positions are given without parentheses for sequence positions and in parentheses for the alignment positions.

related to *w*VulC (major parent) than to *w*VulM in the first 802 bases of the *wsp* sequence (respectively 99.5% and 89.3% of identity). In this region, *w*Nas differs from *w*VulC by three non-synonymous substitutions in the coding region of *wsp* (positions 433, 536 and 614, see Figs. 2 and 3) and 1 substitution in the non-coding intergenic region (position 766 of *w*Nas sequence). *w*Nas and *w*VulC sequences are identical in the last 266 bases of the alignment and differ by 1.9% of divergence from *w*VulM. In the recombinant region, *w*Nas is more closely related to *w*VulM than to *w*VulC (respectively 98.6% and 83.5% of identity). Within the *wsp* coding region, the observed divergence leads to three amino acid changes when compared to *w*VulC protein sequence (Fig. 3). No stop codon or frame shift was found in this region.

3.3. Intergenomic origin of recombinations

Because the same recombinant sequences were found independently in the different samples of *A. vulgare*, it is unlikely that the observed sequences are artefacts. The published *Wolbachia* genomes show two paralogs of the *wsp* gene (*wsp*B and *wsp*C). Therefore intragenomic recombination could occur between the two paralogs and the *wsp* gene (*wspA*) leading to a chimeric form of *wsp*. In order to evaluate the hypothesis of intragenomic recombination, BLAST searches of *w*Vul recombinant fragments were performed against the available *Wolbachia* genomes (*w*Mel, *w*Ana, *w*Pip, and *w*Bm). No significant alignment of the recombinant regions were found while *wspA* and *rpoH* parts of the *w*VulP sequence match respectively with the corresponding regions of *w*Mel genome (1 significant hit) and no significant matches were recorded with the corresponding *wspB* and *wspC* paralogs. These results appear to exclude an intragenomic recombination and suggest intergenic recombinations between the two different *Wolbachia* strains, *w*VulC and *w*VulM.

3.4. Phylogenetic analysis

Phylogenies based on *wsp*, *groE* and *ftsZ* including *Wolbachia* strains infecting other arthropods show topologies similar to those previously published on *16S rRNA*, *ftsZ* and *wsp* (Figs. 1 and 4, see also Bouchon et al., 1998, Cordaux et al., 2001). For all genes, *Wolbachia* infecting terrestrial isopods form a monophyletic clade inside the B-supergroup.

4. Discussion

4.1. Evidence for recombination

Five *Wolbachia* strains have been observed to infect *Armadillidium* species: *w*VulC, *w*VulM and a new one, *w*VulP, found in *A. vulgare*, *w*Nas found in *A. nasatum* and *w*Album found in *A. album*. *wsp* sequence comparisons and statistical analysis reveal the existence of recombination between feminizing *Wolbachia* strains. Two recombinant strains (*w*VulP and *w*Nas) were identified in two different host species within the genus *Armadillidium*. In both cases, statistical analyses suggest that a small gene fragment (61 bp in *w*VulP and 70 bp in *w*Nas) of a strain closely related to *w*VulM (minor parent) has been inserted into the genome of an other strain closely related to *w*VulC (major parent). No evidence of intragenomic recombination has been found within the two *wsp* paralog genes recorded in the *Wolbachia* genomes (Foster et al., 2005, Wu et al., 2004). The two recombinant strains *w*VulP and *w*Nas show only two nucleotide differences in the *wsp* and *rpoH* sequences, recombinant regions excluded. This confirms the previous work of Cordaux et al. (2004) suggesting that *A. vulgare* and *A. nasatum* share a common ancestral *Wolbachia* strain which constitutes the major parent of the two recombinant strains.

4.2. Recombination consequences on phylogenetic analysis

None of the recombination events described here confound the evolutionary relationships of *Wolbachia* strains because recombinations occurred between closely related strains of the same group (Figs. 1 and 4) and because the recombinant fragments are too small. This is confirmed by previous results using four different genes (*16S rDNA*, *ftsZ*, *wsp* and *groE*) where *Wolbachia* infecting isopod species clustered together (Bouchon et al., 1998, Cordaux et al., 2001). Moreover, due to poor alignment accuracy, the 4th HVR of *wsp*, where recombination occurs, is generally removed from phylogenetic analyses.

4.3. Intragenomic recombination

BLAST searches using the recombinant sequences as queries produce no significant alignment with any already known *wsp* paralogs. This confirms that an intragenomic recombination is unlikely within the feminizing *Wolbachia*. However we cannot completely exclude this possibility because the *w*Vul *wsp* paralogs are not yet known.

4.4. Evolutionary implications

The existence of recombinant *Wolbachia* strains in *Armadillidium* species offers new insight into the mechanisms that control genetic diversity of feminizing *Wolbachia*. A number of studies have shown multiple infections of *Wolbachia* that

```
wVulC    1    SYYVRLQYNG EVLPFKTKID GIEYKKNN-D AQDPLKASFM AGSGAFGYKM DDIRVDVEGL
wVulP    1    .......... .......... ........-. .......... .......... ..........
wVulM    1    .......... .IS....... ......D.K. .......... .......... ..........
wNas     1    .......... .......... ........-. .......... .......... ..........
wAlbum   1    .......... .......... ........-. .......... .......... ..........

wVulC    60   YSQLNKNDVS GAAFTPVTVA DSVTAFSGLV NVYYDVAIED MPITPYVGVG VGAAYVSNPL
wVulP    60   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wVulM    61   .......... ..V...A... .N........ .......... ..V....... .....F...S
wNas     60   .......... .......... .......... .......... .......... ..........
wAlbum   60   .......... .......... .......... .......... .......... ..........

wVulC    120  ATKVAGDKDS GFGFAYQAKA GVSYDVTPEI KLYAGARYFG SYGANFDGTK QDPAHPDDLE
wVulP    120  .......... .......... ....N..... .......... .........E. KQGSG----A
wVulM    121  SADTVR.QK- .......... .......... .......... ....K...E. KQGSG----.
wNas     120  .......... .......... ....N..... .......... .......... .......P.
wAlbum   120  .......... .......... .......... .......... .......... ..........
                                                                  1

wVulC    180  KKVT--DKGA HKVFYSTIGA  EAGVAFNF
wVulP    176  EE..TT.... Y......... ....V...
wVulM    176  SE..T-.... Y......... ........
wNas     180  ....--.... .......... ....V...
wAlbum   180  ....--.... .......... ....V...
                         2
```

Fig. 3. Alignment of the deduced amino acid sequences of the *wsp* gene in the five *Wolbachia* strains sequenced in the *Armadillidium* genus. 1st position of the alignment corresponds to the 36th position of the WSP protein. Numbers under sequence alignments correspond to breakpoints identified with DNAsp on DNA sequences.

induce CI in insects (e.g. Vavre et al., 1999, Werren and Windsor, 2000, Werren et al., 1995) and there is a growing amount of evidence indicating the existence of horizontal transfers between host species (e.g. Cordaux et al., 2001, Cordaux et al., 2004, van Borm et al., 2003, Vavre et al., 1999). As CI actively maintains multiple infections (Frank, 1998), horizontal transfers and recombination events may be favoured in such *Wolbachia* strains. The present study suggests that such recombination events can also occur in feminizing *Wolbachia*. Natural multiple infections in a single host have been demonstrated in neither *A. vulgare*, nor any other woodlouse species. As previously proposed by Cordaux et al. (2004) in

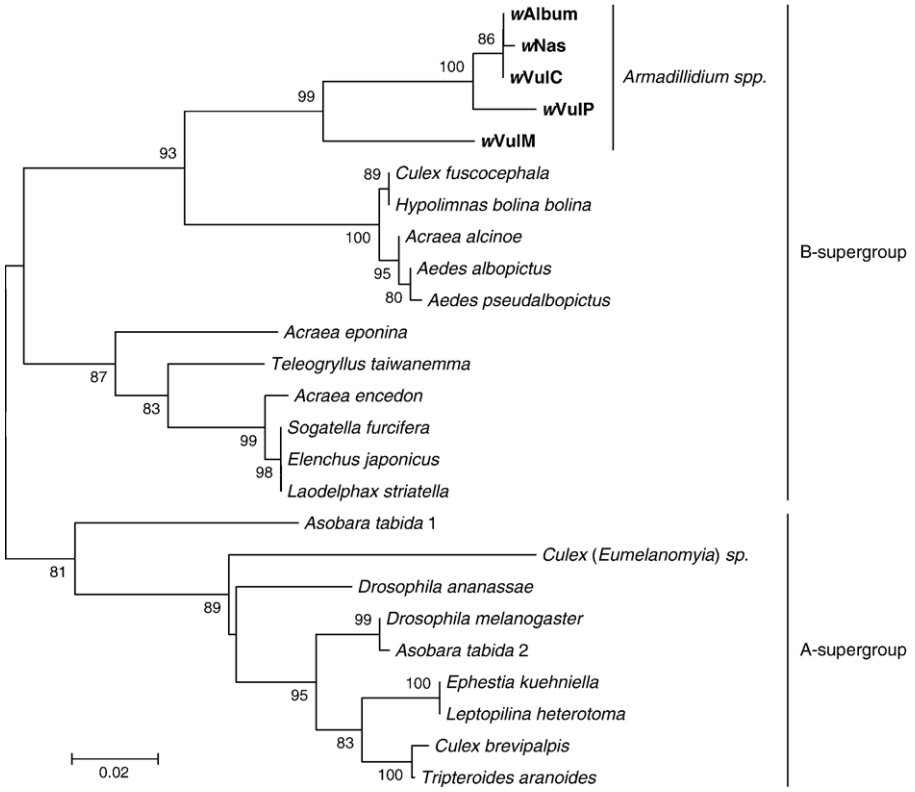


Fig. 4. Phylogenetic tree of *Wolbachia* strains based on *wsp*. The tree is based on the comparison of 528 bases of the *wsp* gene, using the neighbor-joining method. Numbers at the nodes are bootstrap scores. Only values higher than 50 are shown. Strains are identified by the host from which they were isolated. The five *Wolbachia* strains from *Armadillidium* species (*w*VulC, *w*VulM, *w*VulP, *w*Nas and *w*Album) are shown in bold. Accession numbers of *wsp* sequences from other arthropod symbionts are listed in Table 2.

A. vulgare, multi-infections are expected when horizontal transfers occur. In isopods, such horizontal transfers can occur by blood contact between wounded infected and uninfected woodlice (Rigaud and Juchault, 1995) or by the route of parasitism (parasitoid flies or phoretic mites; Cordaux et al., 2001). Using experimental horizontal transfers, Bouchon et al. (1998) have shown that *A. nasatum* and *A. vulgare Wolbachia* strains can feminize different closely related isopod species. Rigaud et al. (2001) showed similar results but demonstrated that after experimental horizontal transfer, the vertical transmission of *Wolbachia* is not always successful. Moreover, *Wolbachia* horizontal transfer from *A. vulgare* to *A. nasatum* results in both effective feminisation and vertical transmission but the reverse transfer from *A. nasatum to A. vulgare* ends in both less effective feminisation and vertical transmission. This asymmetry in resulting phenotype highlights the fact that even closely related *Wolbachia* strains are adapted to their own hosts. The *Wolbachia* strain of *A. vulgare* used in the study of Rigaud et al. (2001), which has the same origin as *w*VulC, seems less specialised than the strain of *A. nasatum*.

Due to the symbiotic life of *Wolbachia*, a short period of contact between two bacteria in a single host cell is sufficient to favour recombination. One scenario is that double infections of parental *Wolbachia* strains have occurred in one individual. Recently, simultaneous injections of two different *Wolbachia* strains in *A. vulgare* have led to stable bi-infections in the recipients for at least nine months (Johnson, pers. comm.). The strains were transmitted independently to the progeny. If there is a recombination event, this suggests that the new recombinant strain can be transmitted to the next generation, and then spread in the population.

WO-B phage element is known to recombine between different *Wolbachia* strains infecting the host (Bordenstein and Wernegreen, 2004). According to the "intracellular arena" hypothesis, WO-B phage could play a role in recombination by transferring genetic material from one strain to another within a single host. WO-B phage is also present in *w*Vul strains (Braquart-Varnier et al., 2005). However no evidence of horizontal transfer of WO-B phage from a host to another has yet been found.

4.5. wVulC, an invading strain?

Although *w*Nas is the only *Wolbachia* strain known in *A. nasatum*, this study demonstrates a genetic exchange with one strain from *A. vulgare*. Horizontal transfers are expected between *A. vulgare* and *A. nasatum*, because they are found in the same biotopes (i.e. grass-land, gardens). On the contrary, no genetic exchange is expected with *A. album* which is a coastal species inhabiting sandy beaches and is rarely found in close contact with other woodlice species. As recombination allows the acquisition of new genetic material and potentially a new capacity to adapt to new hosts, it may help the successful colonization of non-adapted *Wolbachia* strain in an already infected host. In that respect, *w*VulC (which is potentially the major parent of the recombinant strains) seems to be spreading within the *Armadillidium* spp. hosts. This corroborates the hypothesis of Cordaux et al. (2004) who suggested that *w*VulC is a recent invader of *A. vulgare* populations, *w*VulM being the initial resident. The recombination observed in the *w*VulP strain could be the result of the contact between *w*VulC and *w*VulM in the same populations.

In conclusion, the discovery of recombinant *Wolbachia* strains infecting *Armadillidium* species suggests that recombination can occur in feminizing *Wolbachia* even if no evidence of multiple-infections has been shown to date. New bacterial acquisitions by horizontal transfers of *Wolbachia* seem to be frequent in *Armadillidium* species and could be a major source of *Wolbachia* genetic diversity.

Acknowledgements

The PhD work of Sébastien Verne is supported by a doctoral fellowship from the Région Poitou-Charentes.

We thank Daniel Guyonnet and Carine Delaunay for technical assistance. We are grateful to Laura Baldo for comments on the previous version of the manuscript.

References

Baldo, L., Lo, N., Werren, J.H., 2005a. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. Journal of Bacteriology 187, 5406–5418.

Baldo, L., Bordenstein, S., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., 2005b. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. Molecular Biology and Evolution 23, 437–449.

Baldo, L., et al., 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Applied Environmental Microbiology 72, 7098–7110.

Bordenstein, S.R., Wernegreen, J.J., 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. Molecular Biology and Evolution 21, 1981–1991.

Bouchon, D., Rigaud, T., Juchault, P., 1998. Evidence for wide-spread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 265, 1081–1090.

Braig, H.R., Zhou, W., Dobson, S.L., O'Neill, S.L., 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Journal of Bacteriology 180, 2373–2378.

Braquart-Varnier, C., Grève, P., Félix, C., Martin, G., 2005. Bacteriophage WO in *Wolbachia* infecting terrestrial isopods. Biochemical and Biophysical Research Communications 337, 580–585.

Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Bouchon, D., 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. Journal of Evolutionary Biology 14, 237–243.

Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Frelon-Raimond, M., Rigaud, T., Bouchon, D., 2004. Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. Heredity 93, 78–84.

Duron, O., Lagnel, J., Raymond, M., Bourtzis, K., Fort, P., Weill, M., 2005. Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. Molecular Ecology 14, 1561–1573.

Foster, J., et al., 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biology 3, E121.

Frank, S.A., 1998. Dynamics of cytoplasmic incompatibility with multiple *Wolbachia* infections. Journal of Theoretical Biology 192, 213–218.

Gibbs, M.J., Armstrong, J.S., Gibbs, A.J., 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. Bioinformatics 16, 573–582.

Hudson, R.R., Kaplan, N.L., 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. Genetics 111, 147–164.

Jiggins, F.M., 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. Molecular Biology and Evolution 19, 1640–1643.

Jiggins, F.M., Hurst, G.D., Schulenburg, J.H., Majerus, M.E., 2001. Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. Heredity 86, 161–166.

Keller, G.P., Windsor, D.M., Saucedo, J.M., Werren, J.H., 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (*Chrysomelidae, Cassidinae*). Molecular Ecology 13, 2405–2420.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinformatics 5, 150–163.

Legrand, J.J., Juchault, P., 1986. Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la speciation chez des crustacés oniscoïdes. Bolletino di Zoologia 53, 161–172.

Malloch, G., Fenton, B., 2005. Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. Molecular Ecology 14, 627–637.

Martin, D., Rybicki, E., 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. Bioinformatics 16, 562–563.

Masui, S., Kamoda, S., Sasaki, T., Ishikawa, H., 2000. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. Journal of Molecular Evolution 51, 491–497.

Maynard Smith, J., 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. Journal of Molecular Evolution 34, 126–129.

Michel-Salzat, A., Cordaux, R., Bouchon, D., 2001. *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (*Crustacea*, *Oniscidea*): evidence for host-dependant patterns of infection. Heredity 87, 428–434.

Moret, Y., Juchault, P., Rigaud, T., 2001. Wolbachia endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. Heredity 86, 325–332.

O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L., Robertson, H.M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 2699–2702.

Paraskevopoulos, C., Bordenstein, S.R., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., Bourtzis, K., 2006. Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. Current Microbiology 53, 388–395.

Posada, D., 2002. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: real data. Molecular Biology and Evolution 19, 708–717.

Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 13757–13762.

Reuter, M., Keller, L., 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. Molecular Biology and Evolution 20, 748–753.

Rigaud, T., 1999. Further *Wolbachia* endosymbiont diversity: a tree hiding in the forest? Trends in Ecology & Evolution 14, 212–213.

Rigaud, T., Juchault, P., 1995. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. Journal of Evolutionary Biology 8, 249–255.

Rigaud, T., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Mocquart, J.P., Juchault, P., 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. Endocytobiosis and Cell Research 7, 259–273.

Rigaud, T., Antoine, D., Marcadé, I., Juchault, P., 1997. The effect of temperature on sex ratio in the isopod *Porcellionides pruinosus*: environmental sex determination or a by-product of cytoplasmic sex determination? Evolutionary Ecology 11, 205–215.

Rigaud, T., Pennings, P.S., Juchault, P., 2001. *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. Journal of Invertebrate Pathology 77, 251–257.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19, 2496–2497.

Salminen, M.O., Carr, J.K., Burke, D.S., McCutchan, F.E., 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. AIDS Research and Human Retroviruses 11, 1423–1425.

Salzberg, S.L., et al., 2005. Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species. Genome Biology 6, R23.

Schulenburg, J.H., Hurst, G.D., Huigens, T.M., van Meer, M.M., Jiggins, F.M., Majerus, M.E., 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. Molecular Biology and Evolution 17, 584–600.

Stouthamer, R., Breeuwer, J.A., Hurst, G.D.D., 1999. *Wolbachia* pipientis: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual of Review of Microbiology 53, 71–102.

van Borm, S., Wenseleers, T., Billen, J., Boomsma, J.J., 2003. Cloning and sequencing of wsp encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex* leafcutter ants. Molecular Phylogenetics and Evolution 26, 102–109.

Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., Bouletreau, M., 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host–parasitoid associations. Molecular Biology and Evolution 16, 1711–1723.

Werren, J.H., Windsor, D.M., 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 267, 1277–1285.

Werren, J.H., Bartos, J.D., 2001. Recombination in *Wolbachia*. Current Biology 11, 431–435.

Werren, J.H., Windsor, D.M., Guo, L., 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 262, 197–204.

Wu, M., et al., 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis w*Mel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. PLoS Biology 2, E69.

Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S.L., 1998. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 265, 509–515.

IX. Bibliographie

Abbot P & Moran NA (2002) Extremely low levels of genetic polymorphism in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids (*Pemphigus*). *Mol Ecol* **11**, 2649-2660.

Al-Dabbagh K & Block W (1981) Population ecology of a terrestrial isopod in two Breckland grass heaths. *J Anim Ecol* **50**, 61-77.

Bailey MF, Delph LF and Lively CM (2003) Modelling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism. *Amer Nat* **161**, 762-776.

Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ and Werren JH (2005a) Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol* **23**, 437-449.

Baldo L, Lo N and Werren JH (2005b) Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *J Bacteriol* **187**, 5406-5418.

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H and Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7098-7110.

Baldo L & Werren JH (2007) Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Curr Microbiol* **55**, 81-87.

Ballard JW & Kreitman M (1994) Unraveling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila*. *Genetics* **138**, 757-772.

Ballard JW, Hatzidakis J, Karr TL and Kreitman M (1996) Reduced variation in *Drosophila simulans* mitochondrial DNA. *Genetics* **144**, 1519-1528.

Ballard JW (2000a) Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. *J Mol Evol* **51**, 64-75.

Ballard JW (2000b) When one is not enough: introgression of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Mol Biol and Evol* **17**, 1126-1130.

Ballard JW & Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* **13**, 729-744.

Balloux F & Goudet J (2002) Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Mol Ecol* **11**, 771-783.

Balloux F & Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* **11**, 155-165.

Bandi C, Anderson TJ, Genchi C and Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond [Biol]* **265**, 2407-2413.

Baudry E, Bartos J, Emerson K, Whitworth T and Werren JH (2003) *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Mol Ecol* **12**, 1843-1854.

Beck M & Price J (1981) Genetic variation in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *J Hered* **72**, 15-18.

Beck M & Price J (1985) Genetic variation and differentiation in *Armadillidium vulgare*. *Genetica* **66**, 15-18.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Bordenstein S & Rosengaus RB (2005) Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Curr Microbiol* **51**, 393-398.

Bordenstein SR, O'Hara FP and Werren JH (2001) *Wolbachia* induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* **409**, 707.

Bordenstein SR & Wernegreen JJ (2004) Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*) : infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. *Mol Biol Evol* **21**, 1981-1991.

Bossart JL & Pashley Prowell D (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: Limitations, lessons and new directions. *Trends Ecol Evolut* **13**, 202-206.

Bouchon D, Rigaud T and Juchault P (1998) Evidence for wide-spread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond [Biol]* **265**, 1081-1090.

Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM and Karr TL (1993) Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* **260**, 1796-1799.

Braig HR, Zhou W, Dobson SL and O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.* **180**, 2373-2378.

Braquart-Varnier C, Grève P, Félix C and Martin G (2005) Bacteriophage WO in *Wolbachia* infecting terrestrial isopods. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 580-585.

Breeuwer JA & Jacobs G (1996) *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol* **20**, 421-434.

Breeuwer JAJ & Werren JH (1990) Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**, 558-560.

Budar F, Touzet P and De Paepe R (2003) The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica* **117**, 3-16.

Bull J (1983) *Evolution of sex determining mechanisms* Benjamin/Cummings Publ. Co., Menlo Park, CA.

Campbell BC, Bragg TS and Turner CE (1992) Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera: Curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect Biochem Mol Biol* **22**, 415-421.

Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ, Werren JH and Bandi C (2005) Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology* **151**, 4015-4022.

Castellano S & Balletto E (2002) Is the partial Mantel test inadequate? *Evolution* **56**, 1871-1873.

Caubet Y (1998) Individual life histories in terretrial isopod populations: a simulation program. *Isr J Zool* **44**, 423-437.

Caubet Y, Hatcher MJ, Mocquard J and Rigaud T (2000) Genetic conflict and changes in heterogametic mechanisms of sex determination. *J Evol Biol* **13**, 766-777.

Charlat S & Mercot H (2001) Cytoplasmic incompatibility and maternal-haploid. *Trends Genet* **17**, 440-441.

Charlat S, Hurst GD and Mercot H (2003a) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet* **19**, 217-223.

Charlat S, Le Chat L and Mercot H (2003b) Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in two continental African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* **90**, 49-55.

Charlesworth B, Morgan MT and Charlesworth D (1993) The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics* **134**, 1289-1303.

Charlesworth D (1981) A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* **46**, 27-39.

Chesser RK & Baker RJ (1996) Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics* **144**, 1225-1235.

Chigira A & Miura K (2005) Detection of 'candidatus *Cardinium*' bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effect on the host. *Exp Appl Acarol* **37**, 107-116.
Chilton C (1901) The terrestrial Isopoda of New Zealand. *Transactions of the Linnean Society of London, Zoology* **8**, 99-152 and plates 111-116.
Clark MA, Moran NA and Baumann P (1999) Sequence evolution in bacterial endosymbionts having extreme base compositions. *Mol Biol Evol* **16**, 1586-1598.
Cockerham CC (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution* **23**, 72-83.
Cockerham CC (1973) Analysis of gene frequencies. *Genetics* **74**, 679-700.
Cordaux R, Michel-Salzat A and Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J. Evol. Biol.* **14**, 237-243.
Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T and Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity* **93**, 78-84.
Cornuet JM & Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
Corré S (2007) Diversité des isopodes terrestres dans la Vienne en fonction des différents types d'habitats, p. 29. Université de Poitiers, Poitiers.
Couvet D, Ronce O and Gliddon C (1998) The maintenance of nucleocytoplasmic polymorphism in a metapopulation: the case of gynodioecy. *Amer Nat* **152**, 59-70.
Czarnetzki AB & Tebbe CC (2004) Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in *Collembola*. *Environ Microbiol* **6**, 35-44.
Dean MD, Ballard KJ, Glass A and Ballard JW (2003) Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics* **165**, 1959-1969.
Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME and Bouletreau M (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *PNAS* **98**, 6247-6252.
Dedeine F, Vavre F, Shoemaker DD and Bouletreau M (2004) Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. *Evolution* **58**, 2167-2174.
Dedeine F, Bouletreau M and Vavre F (2005) *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity* **95**, 394-400.
Di rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M and Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *PNAS* **91**, 3166–3170.
Dobson FS (1982) Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Anim Behav* **30**, 1183-1192.
DuBose RF, Dykhuizen DE and Hartl DL (1988) Genetic exchange among natural isolates of bacteria: recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*. *PNAS* **85**, 7036-7040.
Duron O, Lagnel J, Raymond M, Bourtzis K, Fort P and Weill M (2005) Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens* : evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. *Mol Ecol* **14**, 1561-1573.
Dyer KA & Jaenike J (2004) Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics* **168**, 1443-1455.
Engelstadter J & Hurst GD (2007) The impact of male-killing bacteria on host evolutionary processes. *Genetics* **175**, 245-254.

Escorza-Trevino S & Dizon AE (2000) Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Mol Ecol* **9**, 1049-1060.

Ewens WJ (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor Popul Biol* **3**, 87-112.

Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.

Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.

Favre L, Balloux F, Goudet J and Perrin N (1997) Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proc R Soc Lond [Biol]* **264**, 127-132.

Ferrara FT, S. (1979) A check-list of terrestrial isopods from Africa (south of the Sahara). *Monitore zoologico italiano, Nuova Serie* **Supplemento 12**, 89-215.

Fialho RF & Stevens L (2000) Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc R Soc Lond [Biol]* **267**, 1469.

Fisher RA (1930) *The genetical theory of natural selection* Clarendon Press, Oxford.

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, Vincze T, Ingram J, Moran L, Lapidus A, Omelchenko M, Kyrpides N, Ghedin E, Wang S, Goltsman E, Joukov V, Ostrovskaya O, Tsukerman K, Mazur M, Comb D, Koonin E and Slatko B (2005) The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* **3**, E121.

Frank SA (1998) Dynamics of cytoplasmic incompatibility with multiple *Wolbachia* infections. *J Theor Biol* **192**, 213-218.

Fu Y-X & Li W-H (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**, 693-709.

Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.

Fujii Y, Kageyama D, Hoshizaki S, Ishikawa H and Sasaki T (2001) Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc Biol Sci* **268**, 855-859.

Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K and Gliddon C (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol Ecol* **8**, 1513-1520.

Garthwaite R, Lawson R and Sassaman C (1995) Population genetics of *Armadillidium vulgare* in Europe and North America. *Crustacean Issues* **9**, 145-199.

Ghelelovitch S (1952) Sur le déterminisme génétique de la stérilité dans les croisements entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C R Acad Sci III* **234**, 2386-2388.

Gherna RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L and Brenner DJ (1991) *Arsenophonus nasoniae gen. nov.*, *sp. nov.*, the causative agent of the Son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int J Syst Bacteriol.* **41**, 563-565.

Gibbs MJ, Armstrong JS and Gibbs AJ (2000) Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**, 573-582.

Girman DJ, Vilà C, Geffen E, Creel S, Mills MGL, McNutt JW, Ginsberg J, Kat P, Mamiya KH and Wayne RK (2001) Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Mol Ecol* **10**, 1703-1723.

Goodacre SL, Martin OY, Thomas CFG and Hewitt MG (2006) *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. *Mol Ecol* **15**, 517-527.
Gorham CH, Fang QQ and Durden LA (2003) *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *J Parasitol* **89**, 283-289.
Gotoh T, Noda H and Hong XY (2003) *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity* **91**, 208-216.
Gotoh T, Noda H and Ito S (2007) *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* **98**, 13-20.
Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F- statistics. *J Hered* **86**, 485-486.
Goudet J, Raymond M, de Meeus T and Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**, 1933-1940.
Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html. Updated from Goudet (1995).
Goudet J, Perrin N and Waser P (2002) Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Mol Ecol* **11**, 1103-1114.
Gouyon PH, Vichot F and Van Damme JMM (1991) Nuclear-cytoplasmic male-sterility: single point equilibria versus limit cycles. *Amer Nat* **137**, 498-514.
Grandjean F, Rigaud T, Raimond R, Juchault P and Souty-Grosset C (1993) Mitochondrial DNA polymorphism and feminizing sex factors dynamics in a natural population of *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Genetica* **92**, 55-60.
Grassly NC & Holmes EC (1997) A likelihood method for the detection of selection and recombination using nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* **14**, 239-247.
Green A (1961) A study of Tasmanian Oniscoidea (Crustacea: Isopoda). *Aust J Zool* **9**, 258-364.
Greenwood PJ (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim Behav* **28**, 1140-1162.
Guo SW & Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
Gyllenstrand N & Seppä P (2003) Conservation genetics of the wood ant, *Formica lugubris*, in a fragmented landscape. *Mol Ecol* **12**, 2931-2940.
Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
Hamilton WD (1971) Selection of selfish and altruistic behavior in some extreme models. In: *Man and Beast: Comparative social behavior* (eds. Eisenberg JF, Dilson WS), pp. 57-91. Smithsonian Institute Press, Washington DC.
Harrison S & Hastings A (1996) Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends Ecol Evol* **11**, 180-183.
Hatcher MJ, Taneyhill DE, Dunn AM and Tofts C (1999) Population dynamics under parasitic sex ratio distortion. *Theor Popul Biol* **56**, 11-28.
Hatcher MJ (2000) Persistence of selfish genetic elements: population structure and conflict. *Trends Ecol Evol* **15**, 271-277.
Hatcher MJ, Dunn A and Tofts C (2000) Coexistence of hosts and sex ratio distorters in structured populations. *Evol Ecol Res* **2**, 185-205.
Hein J (1990) Reconstructing evolution of sequences subject to recombination using parsimony. *Math Biosci* **98**, 185-200.
Hein J (1993) A heuristic method to reconstruct the history of sequences subject to recombination. *J Mol Evol* **36**, 396-405.

Hertig M & Wolbach SB (1924) Studies on *Rickettsia*-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* **44**, 329-374.

Hertig M (1936) The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (*gen*. et *sp. n*.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* **28**, 453-486.

Hiroki M, Kato Y, Kamito T and Miura K (2002) Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften* **89**, 167-170.

Hiroki M, Tagami Y, Miura K and Kato Y (2004) Multiple infection with *Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*. *Proc R Soc Lond [Biol]* **271**, 1751-1755.

Hoffmann AA & Turelli M (1997) Cytoplasmic incompatibility in insects. In: *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction* (eds. O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH). Oxford University Press, Oxford, USA.

Holmes EC, Worobey M and Rambaut A (1999) Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol* **16**, 405-409.

Hudson RR & Kaplan NL (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* **111**, 147-164.

Huigens ME, Luck RF, Klaassen RHG, Maas MFPM, Timmermans MJTN, Stouthamer R (2000) Infectious parthenogenesis. *Nature* **405**, 178-179.

Huigens ME, de Almeida RP, Boons PAH, Luck RF and Stouthamer R (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc R Soc Lond [Biol]* **271**, 509–515.

Hunter MS, Perlman SJ and Kelly SE (2003) A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proc R Soc Lond [Biol]* **270**, 2185-2190.

Hurst GD & Jiggins FM (2000) Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg Infect Dis* **6**, 329-336.

Hurst GD & Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc R Soc Lond [Biol]* **272**, 1525-1534.

Hurst GDD, Hammarton TC, Bandi C, Majerus TMO and Bertrand D (1997) The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomagilla maculata* is a member of the Flavobacteria. *Genet Res* **70**, 1-6.

Hurst GDD, Jiggins FJ, Schulenburg J, Bertrand D and West SA (1999a) Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond [Biol]* **266**, 735-740.

Hurst GDD, Schulenburg J, Majerus TMO, Bertrand D and Zakharov IA (1999b) Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. *Insect Mol Biol* **8**, 133-139.

Hurst GDD, Johnson AP, Schulenburg J and Fuyama Y (2000) Male-killing Wolbachia in Drosophila: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* **156**, 699-709.

Hurwood DA, Hughes JM, Bunn SE and Cleary C (2003) Population structure in the freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) inferred from allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity* **90**, 64-70.

Ironside JE, Dunn AM, Rollinson D and Smith JE (2003a) Association with host mitochondrial haplotypes suggests that feminizing microsporidia lack horizontal transmission. *J Evol Biol* **16**, 1077-1083.

Ironside JE, Smith JE, Hatcher MJ, Sharpe RG, Rollinson D and Dunn AM (2003b) Two species of feminizing microsporidian parasite coexist in populations of *Gammarus duebeni*. *J Evol Biol* **16**, 467-473.

Ishikawa H (2003) Insect symbiosis: an introduction. In: *Insect symbiosis* (eds. Bourtzis K, Miller TA), pp. 1-22. CRC Press, Florida, USA.
Itoh T, Martin W and Nei M (2002) Acceleration of genomic evolution caused by enhanced mutation rate in endocellular symbionts. *PNAS* **99**, 12944-12948.
Jakobsen IB & Easteal S (1996) A program for calculating and displaying compatibility matrices as an aid in determining reticulate evolution in molecular sequences. *Comput Appl Biosci* **12**, 291-295.
Jakobsen IB, Wilson SR and Easteal S (1997) The partition matrix: exploring variable phylogenetic signals along nucleotide sequence alignments. *Mol Biol Evol* **14**, 474-484.
James AC & Ballard JW (2000) Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. *Evolution* **54**, 1661-1672.
Jeyaprakash A & Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* **9**, 393–405.
Jiggins FM, Hurst GD and Majerus ME (2000a) Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proc R Soc Lond [Biol]* **267**, 69-73.
Jiggins FM, Hurst GDD and Majerus MEN (2000b) High prevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedena*. *J Evol Biol* **13**, 495.
Jiggins FM, Hurst GD, Schulenburg JH and Majerus ME (2001a) Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. *Heredity* **86**, 161-166.
Jiggins FM, von Der Schulenburg JH, Hurst GD and Majerus ME (2001b) Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc R Soc Lond [Biol]* **268**, 1423-1427.
Jiggins FM (2002) The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. *Mol Biol Evol* **19**, 1640-1643.
Jiggins FM (2003) Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics* **164**, 5–12.
Johnson CN (1986) Sex-biased philopatry and dispersal in mammals. *Oecologia* **69**, 626-627.
Johnstone RA & Hurst GDD (1996) Maternally inherited male-killing microorganisms may confound interpretation of mitochondrial DNA variability. *Biol J Linnean Soc* **58**, 453-470.
Juchault P & Legrand JJ (1972) Croisements de néo-mâles expérimentaux chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé, Isopode, Oniscoïde). Mise en évidence d'une hétérogamétie femelle. *C R Acad Sci III.* **274**, 1387-1389.
Juchault P & Legrand JJ (1976) Etude génétique de l'intersexualité des mâles à ouvertures génitales femelles chez l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr. : interprétation et modalité de la transmission héréditaire. *C R Acad Sci III* **170**, 429-433.
Juchault P, Legrand JJ and Mocquard J (1980) Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs contrôlant le sexe dans les populations du crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare*. I. La population de Niort (Deux Sèvres). *Arch Zool Exp Gén* **121**, 3-27.
Juchault P & Legrand JJ (1981a) Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs contrôlant le sexe dans les populations du crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare*. II. Populations hébergeant le facteur féminisant *F* (bactéroïde intracytoplasmique). *Arch Zool Exp Gén* **122**, 65-74.
Juchault P & Legrand JJ (1981b) Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs contrôlant le sexe dans les populations du crustacé isopode terrestre *Armadillidium*

vulgare. III. Populations n'hébergeant le facteur féminisant *F*. *Arch Zool Exp Gén* **122**, 117-131.
Juchault P & Legrand JJ (1989) Sex determination and monogeny in terrestrial isopods Armadillidium vulgare (Latreille, 1804) and Armadillidium nasatum (Bunde-Lind, 1885). *Monitore zoologico italiano, Nuova Serie* **4**, 359-375.
Juchault P, Louis C, Martin G and Noulin G (1991) Masculinization of female isopods (Crustacea) correlated with non-Mendelian inheritance of cytoplasmic viruses. *PNAS* **88**, 10460-10464.
Juchault P, Legrand JJ and Mocquard JP (1992) Evolution of sex determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* (Latr.) (Crustacea, Isopoda): cmpetition between two feminizing parasitic sex factors. *Heredity* **69**, 382-390.
Juchault P & Mocquart JP (1993) Transfer of a parasitic sex factor to the nuclear genome of the host: a hypothesis on the evolution of sex determining mecanisms in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *J Evol Biol* **6**, 511-528.
Juchault P, Rigaud T and Mocquard JP (1993) Evolution of sex determination and sex ratio variability in wild populations of *Armadillidium vulgare* (Latr.) (Crustacea, Isopoda): a case study in conflict resolution. *Acta Oecologica* **14**, 547-562.
Juchault P, Frelon M, Bouchon D and Rigaud T (1994) New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods : evolutionary implications. *C R Acad Sci III* **317**, 225-230.
Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet* **5**, 539-543.
Kalinowski ST (2005) HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Mol Ecol Notes*, **5**, 187-189.
Kambhampati S, Rai KS and Verleye DM (1992) Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito, *Aedes albopictus*. *Genetics* **132**, 205-209.
Karlin S & McGregor J (1972) Addendum to a paper of W. Ewens. *Theor Popul Biol* **3**, 113-116.
Keller GP, Windsor DM, Saucedo JM and Werren JH (2004) Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (*Chrysomelidae*, *Cassidinae*). *Mol Ecol* **13**, 2405-2420.
Kimura M & Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738.
Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
Knight ME, Oppen MJHv, Smith HL, Rico C, Hewitt GM and Turner GF (1999) Evidence for male-biased dispersal in Lake Malawi cichlids from microsatellites. *Mol Ecol* **8**, 1521-1527.
Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX and Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS* **86**, 6196-6200.
Kumar S, Tamura K and Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150-163.
Lachaise D, Harry M, Solignac M, Lemeunier F, Benassi V and Cariou ML (2000) Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome. *Proc R Soc Lond [Biol]* **267**, 1487-1495.
Lefebvre F & Caubet Y (1999) On the male-effect in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). *Invertebr Repr Dev* **35**, 55-64.
Lefebvre F (2002) *Stratégies de reproduction chez les crustacés isopodes terrestres* Thèse de doctorat, Université de Poitiers, France.

Legrand JJ & Juchault P (1969) Le déterminisme de l'intersexualité chez les crustacés isopodes terrestres : corrélations entre intersexualité et monogénie. *C R Acad Sci III* **268**, 1647-1649.

Legrand JJ & Juchault P (1984) Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie chez le crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. *Gén Sél Evol* **16**, 57-84.

Legrand JJ & Juchault P (1986) Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la speciation chez des crustacés oniscoïdes. *Boll Zool* **53**, 161-172.

Legrand JJ, Legrand E and Juchault P (1987) Sex determination in crustacea. *Biol Rev* **62**, 439-470.

Levins R (1969) The effect of random variations of different types on population growth. *PNAS* **62**, 1061-1065.

Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* **49**, 49-67.

Lewontin RC (1985) Population genetics. In: *Evolution: Essays in Honour of John Maynard-Smith* (eds. Greenwood PJ, Harvey PH, Slatkin M), pp. 3-18. Cambridge University Press.

Li H & Fu Y-X (submitted) NeutralityTest: novel software for performing tests of neutrality. *Bioinformatics*.

Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill S L, Werren JH, Bordenstein SR and Bandi C (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 654-657.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW and Ray SC (1999) Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* **73**, 152-160.

Luikart G & Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conser Biol* **12**, 228-237.

Malloch G & Fenton B (2005) Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. *Mol Ecol* **14**, 627-637.

Marcadé II, Souty-Grosset C, Bouchon D, Rigaud T and Raimond R (1999) Mitochondrial DNA variability and wolbachia infection in two sibling woodlice species. *Heredity* **83 (Pt 1)**, 71-78.

Margulis L (1993) *Symbiosis in cell evolution, 2nd Edition* W.H. Freeman, San Francisco, CA.

Marshall JL (2004) The *Allonemobius-Wolbachia* host-endosymbiont system: evidence for rapid speciation and against reproductive isolation driven by cytoplasmic incompatibility. *Evolution* **58**, 2409-2425.

Martin D & Rybicki E (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* **16**, 562-563.

Martin G, Juchault P and Legrand JJ (1973) Mise en evidence d'un microorganisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoide *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée théligène. *C R Acad Sci III* **276**, 2313-2316.

Maruyama T & Fuerst PA (1985) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* **111**, 675-689.

Masui S, Kamoda S, Sasaki T and Ishikawa H (2000) Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *J Mol Evol* **51**, 491-497.

Maynard-Smith JM & Haigh J (1974) The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res* **23**, 23-35.

Maynard Smith J (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* **34**, 126-129.

Maynard Smith J & Smith NH (1998) Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol* **15**, 590-599.

McCauley DE & Taylor DR (1997) Local population structure and sex ratio: Evolution in gynodioecious plants. *Amer Nat* **150**, 406-419.

McCauley DE, Olson MS, Emery SN and Taylor DT (2000) Population Structure Influences Sex Ratio Evolution in a Gynodioecious Plant. *Amer Nat* **155**, 814-819.

Meirmans PG & Van Tienderen PH (2004) GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol Ecol Notes* **4**, 792–794.

Michel-Salzat A, Cordaux R and Bouchon D (2001) *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (*Crustacea*, *Oniscidea*): evidence for host-dependant patterns of infection. *Heredity* **87**, 428-434.

Moran NA (1996) Accelerated evolution and Muller's rachet in endosymbiotic bacteria. *PNAS* **93**, 2873-2878.

Moreau J, Bertin A, Caubet Y and Rigaud T (2001) Sexual selection in an isopod with *Wolbachia*-induced sex reversal: males prefer real females. *J Evol Biol* **14**, 388-394.

Moreau J & Rigaud T (2003) Variable male potential rate of reproduction: high male mating capacity as an adaptation to parasite-induced excess of females? *Proc R Soc Lond [Biol]* **270**, 1535-1540.

Moret Y, Juchault P and Rigaud T (2001) *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity* **86**, 325-332.

Mossman CA & Waser PM (1999) Genetic detection of sex-biased dispersal. *Mol Ecol* **8**, 1063-1067.

Motter MG (1898) A contribution to the study of the fauna of the Grave. A study of on hundred and fifty disinterments, with some additional experimental observations. *Journal of New York entomological Society* **VI**, 201-231.

Mouton L, Dedeine F, Henri H, Bouletreau M, Profizi N and Vavre F (2004) Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics* **168**, 181-189.

Mulaik S (1960) Contribución al conocimiento de los isópodos terrestres de Mexico (Isopoda, Oniscoidea). *Revista del la Sociedad mexican de Historia natural* **21**, 79-292.

Narita S, Nomura M, Kato Y and Fukatsu T (2006) Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. *Mol Ecol* **15**, 1095-1108.

Negri I, Pellecchia M, MaZZoglio PJ, Patetta A and Alma A (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proc R Soc Lond [Biol]* **273**, 2409-2416.

Nei M (1978) Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* **89**, 583-590.

Nei M & Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* **76**, 5269-5273.

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press, New York, NY, USA.

O'Corry-Crowe GM, Suydam RS, Rosenberg A, Frost KJ and Dizon AE (1997) Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Mol Ecol* **6**, 955-970.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL and Robertson HM (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *PNAS.* **94**, 2699-2702.

O'Neill SL, Hoffmann AA and Werren JH (1997) *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction* Oxford University Press, Oxford, USA.

Ochman H, Elwyn S and Moran NA (1999) Calibrating bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12638-12643.

Ota T & Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* **22**, 201-204.

Paetkau D, Calvert W, Stirling I and Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar Bears. *Mol Ecol* **4**, 347-354.

Pannell J (1997) The Maintenance of Gynodioecy and Androdioecy in a Metapopulation. *Evolution* **51**, 10-20.

Part T (1995) The importance of local familiarity and search costs for age- and sex-biased philopatry in the collared flycatcher. *Anim Behav* **49**, 1029-1038.

Paulian de Félice L (1939) Récoltes de R. PAULIAN et A. VILLIERS dans le Haut Atlas marocain, 1938 (septième note). Isopodes terrestres. *Bulletin de la Société des Sciences naturelles du Maroc* **19**, 191-213.

Peek AS, Vrijenhoek RC and Gaut BS (1998) Accelerated evolutionary rate in sulfur-oxidizing endosymbiotic bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Mol Biol Evol* **15**, 1514-1523.

Perez-Lezaun A, Calafell F, Comas D, Mateu E, Bosch E, Martinez-Arias R, Clarimon J, Fiori G, Luiselli D, Facchini F, Pettener D and Bertranpetit J (1999) Sex-specific migration patterns in Central Asian populations, revealed by analysis of Y-chromosome short tandem repeats and mtDNA. *Am J Hum Genet* **65**, 208-219.

Piry S, Luikart G and Cornuet J-M (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* **90**, 502–503.

Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I and Solignac M (1999) Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in Rhoditini and 'Aylacini' (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Mol Biol* **8**, 185-191.

Poinsot D, Bourtzis K, Markakis G, Savakis C and Mercot H (1998) *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* **150**, 227-237.

Posada D & Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *PNAS* **98**, 13757-13762.

Posada D (2002) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: real data. *Mol Biol and Evol* **19**, 708-717.

Puillandre N (2004) Etude préliminaire du fonctionnement en métapopulation d'*Armadillidium vulgare* à Chizé, p. 45 p. Université de Poitiers, UMR CNRS 6556, Poitiers.

Pulliam HR (1988) Sources, sinks and population regulation. *Amer Nat* **132**, 652-661.

Pulliam HR & Danielson BJ (1991) Sources, sinks, and habitat selection: A landscape perspective on population dynamics. *Amer Nat* **137**, S50-S66.

Pusey AE (1987) Sex-biased dispersal and inbreeding avoidance in birds and mammals. *Trends Ecol Evol* **2**, 295-299.

Queller DC & Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**, 258-275.

Raimond R (1988) Etude du Polymorphisme Enzymatique dans cinq Populations Naturelles d'*Armadillidium vulgare* Latreille (Crustacea Isopoda Oniscidea). In: *Actes de Colloques: Aspects récents de la Biologie des Crustacés, Vol. 8* (eds. Le Gal Y, van Wormhoudt A), pp. 191-194. IFREMER, France.

Randerson JP, Jiggins FM and Hurst LD (2000) Male killing can select for male mate choice: a novel solution to the paradox of the lek. *Proc R Soc Lond [Biol]* **267**, 867-874.

Rasgon JL, Cornel AJ and Scott TW (2006) Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc R Soc Lond [Biol]* **273**, 1603-1611.

Raufaste N & Rousset F (2001) Are partial Mantel tests adequate? *Evolution* **55**, 1703-1705.

Raymond M & Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* **86**, 248-249.

Reuter M & Keller L (2003) High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Mol Biol Evol* **20**, 748-753.

Reynolds KT & Hoffmann AA (2002) Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genet Res* **80**, 79-87.

Reynolds KT, Thomson LJ and Hoffmann AA (2003) The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain popcorn in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **164**, 1027-1034.

Rice WR (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.

Rigaud T, Souty-Grosset C, Raimond R, Mocquart JP and Juchault P (1991) Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. *Endocyt Cell Res* **7**, 259-273.

Rigaud T & Juchault P (1992) Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity* **68**, 47-52.

Rigaud T, Mocquard J and Juchault P (1992) The spread of parasitic sex factors in populations of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea): effects on sex ratio. *Genet Sel Evol* **24**, 3-18.

Rigaud T & Juchault P (1993) Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics* **133**, 247-252.

Rigaud T & Juchault P (1995) Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J Evol Biol* **8**, 249-255.

Rigaud T & Rousset F (1996) What generates the diversity of *Wolbachia*-arthropod interactions? *Biodivers Conserv* **5**, 999-1013.

Rigaud T, Antoine D, Marcadé I and Juchault P (1997) The effect of temperature on sex ratio in the isopod *Porcellionides pruinosus*: Environmental sex determination or a by-product of cytoplasmic sex determination? *Evol. Ecol.* **11**, 205-215.

Rigaud T (1999) Further Wolbachia endosymbiont diversity: a tree hiding in the forest? *Trends Ecol Evol* **14**, 212-213.

Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C and Raimond R (1999) Mitochondrial DNA Polymorphism, Sex Ratio Distorters and Population Genetics in the Isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* **152**, 1669-1677.

Rigaud T, Pennings PS and Juchault P (2001) *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. *J Invertebr Pathol* **77**, 251-257.

Rigaud T & Moreau J (2004) A cost of *Wolbachia*-induced sex reversal and female-biased sex ratios: decrease in female fertility after sperm depletion in a terrestrial isopod. *Proc R Soc Lond [Biol]* **271**, 1941-1946.

Roehrdanz R, Olson D, Bourchier R, Sears S, Cortilet A and Fauske G (2006) Mitochondrial DNA diversity and *Wolbachia* infection in the flea beetle *Aphthona nigriscutis* (Coleoptera: Chrysomelidae): An introduced biocontrol agent for leafy spurge. *Biol Control* **37**, 1-8.

Rokas A, Atkinson RJ, Brown GS, West SA and Stone GN (2001) Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? *Heredity* **87**, 294-304.

Rokas II (2000) *Wolbachia* as a speciation agent. *Trends Ecol Evol* **15**, 44-45.

Ross KG, Shoemaker DD, Krieger MJB, DeHeer CJ and Keller L (1999) Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: A case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. *Mol Biol Evol* **16**, 525-543.

Rossiter SJ, Jones G, Ransome RD and Barratt EM (2000) Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Mol Ecol* **9**, 1131-1135.

Rousset F, Raymond M and Kjellberg F (1991) Cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens*: How to explain a cytotype polymorphism. *J Evol Biol* **4**, 69-81.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P and Solignac M (1992) *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond [Biol]* **250**, 91.

Rousset F & Solignac M (1995) Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *PNAS* **92**, 6389-6393.

Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.

Rousset F (2002) Partial Mantel tests: reply to Castellano and Balletto. *Evolution* **56**, 1874-1875.

Rowley SM, Raven RJ and McGraw EA (2004) *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol* **49**, 208-214.

Rozas J & Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**, 174-175.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X and Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.

Saito S (1986) Ecological distribution and species diversity of terrestrial isopods in western part of Gunma, central Japan. *Bulletin of the biogeographical Society of Japan* **41**, 45-50.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Salminen MO, Carr JK, Burke DS and McCutchan FE (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 1423-1425.

Salvato P, Battisti A, Concato S, Masutti L, Patarnello T and L. Z (2002) Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa - wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* **11**, 2435-2444.

Salzberg SL, Hotopp JC, Delcher AL, Pop M, Smith DR, Eisen MB and Nelson WC (2005) Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species. *Genome Biol* **6**, R23.

Sanetra M & Crozier RH (2003) Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* **12**, 2281-2295.

Sars GO (1899) *An account of the Crustacea of Norway. II. Isopoda.* Bergen Museum, Bergen.

Sawyer S (1989) Statistical tests for detecting gene conversion. *Mol Biol Evol* **6**, 526-538.

Schulenburg JH, Hurst GD, Huigens TM, van Meer MM, Jiggins FM and Majerus ME (2000) Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Mol Biol Evol* **17**, 584-600.

Schulenburg JH, Hurst GD, Tetzlaff D, Booth GE, Zakharov IA and Majerus ME (2002) History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. *Genetics* **160**, 1075-1086.

Scribner KT, Petersen MR, Fields RL, Talbot SL, Pearce JM and Chesser RK (2001) Sex-biased gene flow in spectacled eiders (Anatidae): inferences from molecular markers with contrasting modes of inheritance. *Evolution* **55**, 2105-2115.

Seielstad MT, Minch E and Cavalli-Sforza LL (1998) Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat Genet* **20**, 278-280.

Shoemaker DD, Katju V and Jaenike J (1999) *Wolbachia* and the Evolution of Reproductive Isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* **53**, 1157-1164.

Shoemaker DD, Dyer KA, Ahrens M, McAbee K and Jaenike J (2004) Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection. *Genetics* **168**, 2049-2058.

Silvestri F (1927) Isopodi terrestri raccolti nell'estremo oriente. *Bolletino del Laboratorio de Zoologica Generale e Agraria* **20**, 211-269.

Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annu rev Ecol Syst* **16**, 393-430.

Slatkin M (1989) Population structure and evolutionary progress. *Genome* **31**, 196-202.

Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**, 457-462.

Sneath PHA (1995) The distribution of the random division of a molecular sequence. *Binary* **7**, 148-152.

Sokal RR & F.J. R (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3rd edn. W. H. Freeman and Co., New York.

Sörensen E & Burkett R (1977) A population study of the isopod, *Armadillidium vulgare*, in northeastern Texas. *Southwestern Naturalist (Dallas)* **22**, 375-388.

Souty-Grosset C, Raimond R and Tourte M (1992) Déterminisme épigénétique du sexe et divergence génétique de l'ADN mitochondrial chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé Oniscoïde): variabilité inter et intrapopulations. *C R Acad Sci Paris (Série D)* **314**, 119-125.

Stephens JC (1985) Statistical methods of DNA sequence analysis: detection of intragenic recombination or gene conversion. *Mol Biol Evol* **2**, 539-556.

Stevens L, Giordano R and Fialho RF (2001) Male-Killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annu Rev Ecol Syst* **32**, 519-545.

Stouthamer R (1997) *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction* (eds. O'Neill S L, Hoffmann AA, Werren JH), pp. 102-124. Oxford Univerity Press, USA.

Stouthamer R, Breeuwer JA and Hurst. GDD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* **53**, 71-102.

Taiti S & Ferrara F (1991) New species and records of terrestrial isopods (Crustacea) from the Arabian Peninsula. *Fauna of Saudi Arabia* **12**, 209-224.

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**, 437-460.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.

Tajima F (1993) Measurement of DNA polymorphism. In: *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology* (eds. Takahata N, Clark AG), pp. 37-59. Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., Tokyo, Sunderland.

Takahata N (1994) Comments on the detection of reciprocal recombination or gene conversion. *Immunogenetics* **39**, 146-149.

Tamura K (1992) The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* **9**, 814-825.

Taylor DR (1990) Evolutionary consequences of cytoplasmic sex-ratio distorters. *J Evol Ecol* **4**, 235-248.

Taylor MJ & Hoerauf A (1999) *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* **15**, 437-442.

Telschow A, Hammerstein P and Werren JH (2005) The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* **59**, 1607-1619.

Telschow A, Engelstadter J, Yamamura N, Hammerstein P and Hurst GD (2006) Asymmetric gene flow and constraints on adaptation caused by sex ratio distorters. *J Evol Biol* **19**, 869-878.

Tiedemann R, Paulus KB, Scheer M, Von Kistowski KG, Skírnisson K, Bloch D and Dam M (2004) Mitochondrial DNA and microsatellite variation in the eider duck (*Somateria mollissima*) indicate stepwise postglacial colonization of Europe and limited current long-distance dispersal. *Mol Ecol* **13**, 1481-1494.

Turelli M, Hoffmann AA and McKechnie SW (1992) Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics* **132**, 713-723.

Valdes AM, Slatkin M and Freimer NB (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**, 737-749.

van Borm S, Wenseleers T, Billen J and Boomsma JJ (2003) Cloning and sequencing of *wsp* encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex* leafcutter ants. *Mol Phylogenet Evol* **26**, 102-109.

Van Name W (1936) The American land and freshwater isopod Crustacea. *Bulletin of the American Museum of natural History* **71**, 1-535.

Van Name W (1942) A second supplement to the American land and freshwater isopod Crustacea. *Bulletin of the American Museum of natural History* **80**, 299-329.

Vandekerckhove TT, Watteyne S, Willems A, Swings JG, Mertens J and Gillis M (1999) Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 279-286.

Vandel A (1953) Les isopodes terrestres des provinces d'Almeria et de Granada. *Archivos del Instituto de Aclimatación (Almeria)* **1**, 45-75.

Vandel A (1962) Faune de France, 66. Isopodes terrestres (deuxième partie), pp. 417-931, Paris.

Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P and Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* **16**, 1711-1723.

Verne S, Puillandre N, Brunet G, Gouin N, Samollow PB, Anderson JD and Grandjean F (2006) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Mol Ecol Notes* **6**, 328-330.
Verne S, Johnson M, Bouchon D and Grandjean F (2007) Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* **397**, 58-66.
Wade MJ & Stevens L (1985) Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (Genus *Tribolium*). *Science* **1985**, 527.
Wade MJ & Chang NW (1995) Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature* **373**, 72.
Watterson GA (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor Popul Biol* **7**, 256-276.
Weeks AR, Marec F and Breeuwer JAJ (2001) A Mite Species That Consists Entirely of Haploid Females. *Science* **292**, 2479-2482.
Weeks AR, Tracy Reynolds K and Hoffmann AA (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Ecol Evol* **17**, 257-262.
Weeks AR & Stouthamer R (2004) Increased fecundity associated with infection by a *cytophaga*-like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis*. *Proc R Soc Lond [Biol]* **271 Suppl 4**, S193-195.
Weiller GF (1998) Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol Biol Evol* **15**, 326-335.
Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
Wenseleers T, Ito F, Van Borm S, Huybrechts R, Volckaert F and Billen J (1998) Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proc R Soc Lond [Biol]* **265**, 1447-1452.
Wernegreen JJ (2002) Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat Rev Genet* **3**, 850-861.
Werren JH, Windsor DM and Guo L (1995a) Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc R Soc Lond [Biol]* **262**, 197-204.
Werren JH, Zhang W and Guo L (1995b) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond [Biol]* **261**, 55-71.
Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* **423**, 587.
Werren JH & Windsor DM (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond [Biol]* **267**, 1277–1285.
Werren JH & Bartos JD (2001) Recombination in *Wolbachia*. *Curr Biol* **11**, 431-435.
West SA, Cook JM, Werren JH and Godfray HC (1998) *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol Ecol* **7**, 1457.
Whitlock MC & McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: *FST* not equal to 1/(4*Nm* + 1). *Heredity* **82 (Pt 2)**, 117-125.
Wolff JO & Plissner JH (1998) Sex biases in avian natal dispersal: an extension of the mammalian model. *Oïkos* **83**, 327-330.
Worobey M (2001) A novel approach to detecting and measuring recombination: new insights into evolution in viruses, bacteria, and mitochondria. *Mol Biol Evol* **18**, 1425-1434.
Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of eugenics* **1951**, 323-354.
Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* **19**.
Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM,

Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL and Eisen JA (2004) Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis w*Mel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* **2**, E69.

Yen JH & Barr AR (1971) New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature* **232**, 657-658.

Yen JH & Barr AR (1973) The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in Culex pipiens. *J Invertebr Pathol* **22**, 242.

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL and Hunter MS (2001) A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *PNAS* **98**, 12555-12560.

Zchori-Fein E & Perlman SJ (2004) Distribution of the bacterial symbiont Cardinium in arthropods. *Mol Ecol* **13**, 2009-2016.

Zerra AJ & Denno RF (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu Rev Entomol* **42**, 207-231.

Zhou W, Rousset F and O'Neill SL (1998) Phylogeny and PCR based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond [Biol]* **265**, 509-515.

Diversité et impact des *Wolbachia* féminisantes sur la structuration génétique d'*Armadillidium vulgare*

Parmi les endosymbiotes, *Wolbachia pipientis* constitue à la fois le parasite de la reproduction le plus largement étudié et celui qui présente la plus grande variété d'effets sur son hôte. De par les manipulations de la reproduction de son hôte, *Wolbachia* est susceptible d'affecter la structuration génétique de son hôte. *Armadillidium vulgare* (Crustacé isopode) présente l'originalité d'héberger deux souches de *Wolbachia* féminisantes (*w*VulC et *w*VulM), ainsi qu'un facteur génétique féminisant non identifié (*f*). Au cours de ce travail, une troisième souche de *Wolbachia* vraisemblablement apparue par recombinaison des deux autres a été mise en évidence. Les prévalences de *Wolbachia* sont généralement faibles mais varient fortement d'une population à l'autre. La structuration génétique de l'hôte *A. vulgare* a été analysée à une échelle subrégionale, puis à l'échelle d'une métapopulation. L'utilisation de marqueurs microsatellites a révélé une diversité génétique importante et une structuration génétique faible, compatible avec un isolement par la distance (IBD). L'analyse du polymorphisme mitochondrial révèle au contraire un polymorphisme intra-populations faible et une forte structuration inter-populations, incompatible avec un IBD. Il est proposé que les facteurs féminisants soient soumis à sélection fréquence dépendante et qu'ils favorisent le maintien d'un petit nombre de mitotypes divergents par auto-stop génétique. Au sein de la métapopulation de la RBI de Chizé, une plus faible dispersion des femelles que des mâles et une forte connectivité des sous-populations semble favoriser de fortes prévalences de *Wolbachia*. L'analyse des biais de structuration génétique liés au sexe révèle que les facteurs féminisants tels que *Wolbachia* et *f* peuvent fortement biaiser les fréquences des mitotypes observés entre les sexes, mais aussi induire des biais de structuration génétique sur l'ADN nucléaire.

MOTS-CLES : *Armadillidium vulgare*, *Wolbachia pipientis*, féminisation, génétique des populations, métapopulation, biais de dispersion.

Diversity and impact of feminizing *Wolbachia* on the genetic structuration of *Armadillidium vulgare*

Among endosymbionts, *Wolbachia pipientis* is the most studied reproductive parasite. This parasite also induces the most diverse effects on its hosts. By manipulating host reproduction, *Wolbachia* is therefore expected to affect the host genetic structuration. *Armadillidium vulgare* (Isopod Crustacean) is known to host two feminizing *Wolbachia* strains (*w*VulC and *w*VulM), as well as another unidentified feminizing genetic factor (*f*). This work shows the discovery of a third *Wolbachia* strain that is probably appeared by recombination of the two previously known strains. *Wolbachia* prevalence is generally low but varies greatly among populations. Genetic structuration of the host *A. vulgare* was analyzed both at a sub-regional scale and at a metapopulation scale. The use of microsatellite markers reveals a high genetic diversity and a low genetic structuration between populations that is compatible with isolation by distance (IBD). mtDNA shows a low polymorphism within populations and a high genetic structuration among populations, that is incompatible with IBD. As a consequence, it is proposed that feminizing factors evolve under frequency dependent selection and favor the maintenance of a low number of divergent mitotypes by genetic hitchhiking. Within the metapopulation of the RBI of Chizé, a lower female than male dispersal and a high connectivity between subpopulations seems to favor a high *Wolbachia* prevalence. The analyses of sex-bias in genetic structuration indicates that feminizing factors, like *Wolbachia* and *f*, can highly bias mitotype frequencies between sexes, but also induce a sex biased genetic structuration on nuclear DNA.

KEYWORDS: *Armadillidium vulgare*, *Wolbachia pipientis*, feminization, population genetic, metapopulation, dispersion bias.