Mécanismes évolutifs à la base du maintien de la diversité génétique et conséquences adaptatives chez l'isopode terrestre armadillidium vulgare

Sylvine Durand

▶ **To cite this version:**

Sylvine Durand. Mécanismes évolutifs à la base du maintien de la diversité génétique et conséquences adaptatives chez l'isopode terrestre armadillidium vulgare. Génétique animale. Université de Poitiers, 2017. Français. NNT : 2017POIT2287 . tel-01980843

HAL Id: tel-01980843
https://theses.hal.science/tel-01980843

Submitted on 14 Jan 2019

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.

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale Gay Lussac
Secteur de Recherche : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Laboratoire d'accueil : Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions – UMR 7267
Equipe Ecologie, Evolution, Symbiose, Poitiers

Présentée par :

Sylvine Durand

MÉCANISMES ÉVOLUTIFS À LA BASE DU MAINTIEN DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET CONSÉQUENCES ADAPTATIVES CHEZ L'ISOPODE TERRESTRE *ARMADILLIDIUM VULGARE*

Directrice de Thèse : Christine Braquart-Varnier
Co-directrice de Thèse : Sophie Beltran-Bech

Soutenue le 28 novembre 2017
devant la Commission d'Examen

JURY

Jérôme Boissier	Professeur, Université de Perpignan via Domitia	Rapporteur
Thierry Rigaud	Directeur de Recherche CNRS, Université de Bourgogne	Rapporteur
Jean-François Lemaître	Chargé de Recherche CNRS Université Lyon 1	Examinateur
Joël Meunier	Chargé de Recherche CNRS, Université de Tours	Examinateur
Christine Braquart-Varnier	Professeur, Université de Poitiers	Directrice
Sophie Beltran-Bech	Maître de conférences, Université de Poitiers	Co-directrice

Cette thèse a été financée par la région Nouvelle-Aquitaine (anciennement région Poitou-Charentes).

REMERCIEMENTS

Trois années passées dans le petit monde des cloportes, quelle folle histoire... Parce que la thèse est aussi et surtout une aventure collective, je me dois de remercier l'ensemble des personnes qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui.

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury de thèse, Jérôme Boissier, Thierry Rigaud, Jean-François Lemaître et Joël Meunier, d'avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai pu réaliser durant ces trois années de labeur. Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse pour leurs conseils. Merci à Benjamin Gourbal, fidèle au poste malgré les soucis technologiques qui ont conduit à un deuxième comité de thèse quelque peu folklorique... Merci également à Aurélie Cohas, pour son aide inestimable sur les statistiques et son regard acéré sur les différentes versions du manuscrit BES qui m'a fait tellement progresser en termes de rédaction scientifique ! Merci enfin à Franck Dedeine, qui m'a fait confiance pendant mes années tourangelles et qui a continué à me suivre lors de ma transition des insectes aux crustacés.

Christine, Sophie, vous avez été géniales ! Merci du fond du cœur pour votre bienveillance et votre soutien. Vous m'avez accordé une grande liberté pendant ces trois ans, mais avez toujours été présentes et réactives dès que j'en avais besoin. Je n'aurais pu rêver de meilleures encadrantes ! Désormais, je sais faire les dilutions mieux que personne (ben quoi, 5 bactéries par individu c'est pas assez ?). L'aventure est loin d'être terminée, puisqu'il nous reste encore (entre autres) à élucider les mystères des SNP… et moi aussi, « il me tarde » !

Je souhaite également remercier les membres du laboratoire, notamment Pierre et Didier pour le travail que vous fournissez chaque jour pour faire tourner le laboratoire. Merci aux super-techniciennes du labo, Maryline et Tiffany pour votre aide ô combien précieuse sur la manip *Salmo*, Catherine et ta dextérité impressionnante, toujours en fredonnant, Carine qui a toujours réponse à toutes les questions, Hélène et ta gestion impeccable des TP (« Les portoirs ! Mais ils sont où les portoirs ?! »), Alex, général en chef des armées de cloportes, et Alina. Merci aussi à Christelle qui déjoue toujours avec brio les embûches administratives. Je remercie également tous les membres du labo pour les discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir entre ces murs. Je pense en particulier à Nico pour sa bonne humeur, et à Joanne qui a toujours un bon conseil à donner.

Merci également à tous les étudiants qui ont fait leur stage avec moi, Solène, Vincent, Cybèle et son enthousiasme débordant (voire effrayant ?) ainsi que Clémentine pour les nombreuses heures passées dans notre minuscule salle surchauffée à entonner des rengaines du siècle dernier. Merci également à Fanny et Coraline, que je n'ai jamais rencontrées mais qui ont contribué à la première publication de cette thèse.

Bien entendu, je n'oublierai pas les locataires (passés ou présents) de la salle des doctorants. Jessica et Lise, merci d'avoir joué le rôle des « sages » (bon, pas toujours hein !) vers qui se tourner quand on a besoin de conseils. Vico, irréductible breton au sourire renversé, aussi inébranlable qu'un menhir quand on essaye de le faire changer d'avis ! Merci pour cette collaboration sur la manip multipaternité, on a eu du mal à s'accorder au début mais on s'en est sortis avec brio ! Margot, je n'ai jamais rencontré personne qui soit aussi attachante et rayonnante de joie et de générosité que toi ! Ta bonté te perdra, c'est sûr, à moins que ce ne soit ton émotivité ? C'était un véritable plaisir de te cotoyer tous les jours… bon, un peu moins les jours où Bowie parfumait la pièce bien entendu ! Thomas, modèle de diplomatie, mon camarade de galère de fin de thèse et pourvoyeur de café (oui, il a bien fallu que je m'y mette !) pendant les derniers week-ends. Le chemin a été long depuis le M2, merci pour toutes ces discussions, et aussi tous ces trajets en voiture (je crois que je te dois un plein…). Encore un petit effort, on y est presque ! Benjamin (littéralement benjamin, à 24 h près !), merci pour toutes ces heures à bavarder à propos des copies des étudiants et des épisodes de Dr Who. Promis, maintenant je fais attention à ce que je dis quand je parle de collégiens en TP de stats! Amine, je suis sûre que tu vas adorer ton année d'enseignement, pense juste à bien vérifier l'emploi du temps au cas où ! Marius, je sais qu'un jour la prononciation de « cucurbitacée » n'aura plus aucun secret pour toi. Heureusement que tu es là pour parler insectes! Clémentine, bon courage pour représenter les amphibiens dans ce monde de crustacés. Peut-être que l'an prochain tu pourras faire une gigantesque salade de tomates ! Charlotte, tu vas faire une thèse d'enfer, même les Lyonnais voudront bosser sur le cloporte après avoir vu tes résultats ! Profite à fond !

Merci aussi aux autres « grands » du labo (ou pas !), en particulier Isa, pro de la pipette et maman réconfortante des doctorants, qui m'a fait crapahuter sous les ponts à la suite des chauves-souris ! Florian, Clotilde et Greg, merci pour les soirées jeux ou PLB qui ont agrémenté notre quotidien. Jonathan, j'espère que Chacha se porte bien en Suède. Rémi, merci pour ta présence bruyante, ainsi que pour avoir démontré que les cloportes pouvaient survivre dans des conditions extrêmes d'injection !

Je remercie du fond du cœur mes parents, qui m'ont toujours soutenue et encouragée tout au long de mes études en me fournissant les légumes du jardin et les œufs de nos cocottes, mais à qui je n'ai pas pu rendre visite aussi souvent que je l'aurai voulu pendant ces trois ans... Promis, je vais me rattraper cette année ! Enfin, merci à toi Steven, pour ton amour depuis tout ce temps. Merci d'avoir supporté mes accès de colère/tristesse/joie soudains, je sais que ça n'a pas été facile tous les jours... Merci d'avoir expliqué à petite Val que je ne l'abandonnais pas ces derniers mois, et d'avoir effectué une spécialisation expresse en cuisine (de tarte à la courgette !! Qui l'eût cru ?) et en ménage (finiras-tu par distinguer l'endroit de l'envers des tapis ?) pour que je puisse me consacrer pleinement à la rédaction. Merci d'avoir été à mes côtés pendant ces longues années, et d'être là pour toutes celles encore à venir.

SOMMAIRE

Remerciements **5**

Sommaire **7**

Glossaire **11**

Introduction générale **14**

A. Avantages sélectifs conférés par la diversité génétique 14

I. De l'échelle populationnelle… 14

II. … à l'échelle individuelle 15

1) Corrélations entre hétérozygotie et valeur sélective 15

2) Bases génétiques de la dépression de consanguinité 16

3) Trois hypothèses principales pour expliquer les HFC 16

B. D'où provient la diversité génétique ? 19

I. Mécanismes générateurs de diversité 19

II. Mécanismes de maintien de la diversité génétique 20

1) Maintien de la richesse allélique 20

2) Maintien de l'hétérozygotie 21

C. Sélection sexuelle et diversité génétique individuelle 22

I. Hétérozygotie et compétition intra-sexuelle pour l'accès aux partenaires 22

II. Choix du partenaire sexuel 22

III. Héritabilité de l'hétérozygotie 26

IV. Importance de l'appariement multiple femelle dans la sélection pour les caractéristiques génétiques 28

D. Qu'en est-il chez le cloporte *Armadillidium vulgare*? 30

Chapitre I : Sélection sexuelle pour la diversité génétique, approche expérimentale à l'échelle individuelle **36**

A. Introduction 36

I. Rôles des sexes dans la compétition intra- et intersexuelle 36

II. Sélection pré- et post-copulatoire 42

III. Lien avec la diversité génétique chez *A. vulgare* ? 42

B. Préférence mâle pour les caractéristiques génétiques des femelles 44

I. Présentation de l'étude 44
II. Publication "How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*?" Ethology, 121(11): 1122-1130 (2015) 46

C. Comment des caractéristiques génétiques des mâles conditionnent-elles leur succès de paternité ? 57
I. Présentation de l'étude 57
II. Publication "Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*" Behavioral Ecology and Sociobiology, 71: 90 (2017) 59

D. Des indices sur l'effet de l'ordre d'accouplement 75

E. Conclusion du chapitre I 77

Chapitre II : Etude des stratégies d'appariement, vers les conditions naturelles 78
A. Introduction 78

B. Paternité multiple en populations naturelles 80
I. Présentation de l'étude 80
II. Publication "Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*?" Journal of Evolutionary Biology 30 : 235-243 (2017) 85
III. Pour aller un peu plus loin… 94

C. Sex-ratio et diversité génétique : impact sur les stratégies d'appariement et la sélection sexuelle 96
I. Présentation de l'étude 96
II. Article en préparation : "Sex-ratio variations and sexual selection for genetic characteristics in a terrestrial isopod" 100
III. Ce qu'il reste à faire et à comprendre 126

D. Conclusion du chapitre II 127

Chapitre III : Impact de l'hétérozygotie sur le phénotype 128
A. Introduction 128
I. Corrélations hétérozygotie-valeur sélective chez les invertébrés : une littérature peu abondante 128
II. Divers facteurs conditionnent la détection des HFC 129

1) Différents traits concernés 129
2) Des effets souvent faibles 129
III. Qu'en est-il chez *A. vulgare* ? 131
B. Production de descendants hétérozygotes 132
I. Présentation de l'étude 132
II. Publication "Producing offspring in *Armadillidium vulgare*: effects of genetic diversity and inbreeding", acceptée dans *Evolution and Development* 135
C. Hétérozygotie et immunocompétence 166
I. Introduction 166
II. Matériel et méthodes 172
1) Matériel biologique 172
2) Description générale du protocole expérimental 173
3) Injection de pathogènes 176
4) Mesure des paramètres immunitaires 178
5) Analyses génétiques 179
6) Analyses statistiques 181
III. Résultats 183
1) Corrélation d'hétérozygotie entre paires de loci 183
2) Expérience 1 : suivi des paramètres immunitaires 184
3) Expérience 2 : suivi de la survie 188
IV. Discussion 190
1) Une densité hémocytaire hautement variable 190
2) Des effets de l'injection partagés par tous les individus 191
3) Gravidité : aucun impact ou artefact statistique ? 192
4) Symbiose avec *Wolbachia* : une protection confirmée 193
5) Effet de l'hétérozygotie 194
V. Conclusion 196
D. Conclusion du chapitre III 197

Discussion générale 198
A. L'hétérozygotie est liée à la valeur sélective chez *A. vulgare* 200
I. Immunocompétence 200
II. Morphométrie 200
III. Investigations à mener 201
B. La sélection sexuelle, une affaire de diversité génétique 202

I. Les mâles hétérozygotes ont un meilleur succès 202
II. Choix pour la dissimilarité génétique : un tableau complexe 204
III. Valeur adaptative et conséquences évolutives des processus de sélection sexuelle concernant les caractéristiques génétiques 205

C. De forts taux de paternité multiple chez *A. vulgare* 206
I. Valeur adaptative 207
1) Obtention de bénéfices directs … 207
2) … ou de bénéfices indirects ? 208
3) Distinguer les deux types de bénéfices 209
II. Conséquences évolutives de la paternité multiple 210
1) Compétition spermatique 210
2) Diversité et maintien des populations 211

D. Conclusions 211
I. Le système de reproduction chez *A. vulgare*, un « cercle vertueux » pour la diversité génétique 211
II. Et chez les populations naturelles ? 212
III. *Wolbachia*, parasite de la reproduction… et de la sélection sexuelle pour la diversité génétique ? 213
IV. Quel apport des nouvelles technologies de séquençage à l'étude des HFC chez notre modèle ? 214

Références bibliographiques 216

Annexes 234
Annexe 1 : Présentation générale de l'isopode terrestre *Armadillidium vulgare* 234
Annexe 2 : Publication "When GIS zooms in: spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare*", *Genetica* 1–10 (publié en ligne en 2017) 237
Annexe 3 : Protocole extraction ADN en vue de génotypage de SNP par GBS 247
Annexe 4 : Récapitulatif des modèles complets et minimaux présentés dans le chapitre II partie C 249
Annexe 5 : Densité et viabilité hémocytaire chez les mâles et les femelles au cours d'une expérience pilote 251

GLOSSAIRE

CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) : système de reconnaissance du soi et du non-soi présent chez l'ensemble des vertébrés. Ce système multigénique est extrêmement polymorphe, et est à l'origine de protéines portées à la surface des cellules de l'organisme, permettant de reconnaitre les cellules du soi (CMH de classe I), ou de présenter les antigènes du non-soi aux lymphocytes T (CMH de classe II).

Fécondité : potentiel reproductif d'une femelle, généralement estimée à partir du nombre d'œufs pondus ou d'ovocytes matures.

Fertilité : nombre de descendants obtenus par couple ou par femelle.

HFC (*Heterozygosity-Fitness Correlation*) : corrélation entre l'hétérozygotie d'un individu, qu'elle soit estimée à partir de marqueurs moléculaires ou du pedigree de l'individu, et sa valeur sélective, ou plus généralement un estimateur de sa valeur sélective.

Microsatellite : séquence d'ADN constituée d'une répétition de motifs courts (1 à 4 nucléotides répétés entre 5 et 100 fois). Les microsatellites sont, à de rares exceptions près, sélectivement neutres, abondants dans les génomes eucaryotes et généralement très polymorphes au sein d'une espèce. Ils sont parfois appelés STR (*Short Tandem Repeats*) ou SSR (*Short Sequence Repeats*).

Monogamie : système d'appariement dans lequel les individus des deux sexes ne possèdent qu'un seul partenaire. Lorsque des accouplements ont lieu hors du couple, on parle de monogamie sociale. La monogamie génétique concerne quant à elle les cas de fidélité sexuelle au sein du couple.

Polyandrie : système d'appariement dans lequel les femelles s'apparient avec de multiples mâles.

Promiscuité : système d'appariement dans lequel les femelles s'apparient avec de multiples mâles et les mâles avec de multiples femelles

Qualité génétique : contribution d'un allèle ou d'un ensemble d'allèles (génotype) à la valeur sélective d'un individu.

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) : il s'agit d'un polymorphisme nucléique portant sur la modification d'une seule paire de bases. De telles mutations peuvent arriver au sein de régions codantes ou non. Le cas échéant, elles peuvent conduire à une modification de la protéine (mutation non-synonyme) ou pas (mutation synonyme), en raison de la redondance du code génétique.

Taille d'effet : mesure permettant de quantifier la force de l'effet statistique d'une variable sur une autre. Par exemple, le coefficient de corrélation *r* de Pearson est une mesure de la taille d'effet.

Valeur sélective (*fitness*) : représente la capacité d'un individu d'un génotype donné à se reproduire, c'est-à-dire sa capacité à transmettre ses gènes. Elle prend en compte sa valeur adaptative (survie) et son succès reproducteur. La mesure idéale de la valeur sélective est le nombre de petits-enfants engendrés par l'individu, cependant cette mesure est rarement accessible et des estimateurs sont souvent utilisés (survie, fertilité…).

Volvation : réaction défensive, présente notamment chez *Armadillidium vulgare,* consistant à se rouler en boule afin de se protéger des prédateurs.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

A.Avantages sélectifs conférés par la diversité génétique

I. De l'échelle populationnelle...

La diversité génétique est un paramètre central en génétique des populations, et plus largement en biologie évolutive. Cette diversité, représentant la variabilité des séquences nucléotidiques (ou allèles) au sein d'un individu, d'une population, d'une espèce voire d'un écosystème, constitue en effet le « terreau » nécessaire à l'évolution. Dans *On the origin of species*, Darwin (1859) énumère les conditions nécessaires à la sélection naturelle : (i) des variations phénotypiques doivent exister entre les individus, (ii) ces variations doivent se traduire par une différence interindividuelle dans la valeur sélective* (ou *fitness,* cf. Glossaire), et enfin (ii) ces variations doivent être héritables. La variabilité nucléique est donc le parfait support pour les variations interindividuelles héritables sur lesquelles agit la sélection. C'est un concept majeur de la théorie synthétique de l'évolution, élaborée par divers biologistes tels que Fisher, Haldane, Wright ou Mayr, et synthétisée notamment par Huxley dans *Evolution : a modern synthesis* (Huxley, 1942).

L'importance de la variabilité moléculaire a également été soulignée par Van Valen (1973) dans sa théorie de la Reine Rouge. Selon lui, les organismes doivent constamment s'adapter et évoluer en réponse aux pressions de sélection imposées par leur environnement mais aussi par les autres organismes. Cette théorie explique notamment la course aux armements ayant lieu entre les parasites et leurs hôtes, où chaque innovation évolutive de l'un des partenaires est associée à une réponse de l'autre partenaire (Raberg *et al.*, 2007). La diversité génétique est donc essentielle puisqu'elle sert de base aux nombreuses innovations nécessaires à la coévolution.

Ainsi, une plus grande diversité allélique confère aux populations une meilleure adaptabilité face aux changements d'origine biotique ou abiotique qui pourraient intervenir dans l'environnement (Wennersten & Forsman, 2012; Forsman, 2014; Rius & Darling, 2014). En outre, la perte de diversité génétique au sein des populations est l'un des principaux facteurs à l'origine de l'extinction de

populations ou d'espèces (Frankham, 2005). A l'heure où la biosphère connait sa sixième crise majeure d'extinction (Barnosky *et al.*, 2011), la diversité génétique a été classée comme l'une des trois formes de biodiversité devant faire l'objet de mesures de conservation (McNeely *et al.*, 1990).

II. ... à l'échelle individuelle

1) Corrélations entre hétérozygotie et valeur sélective

L'impact positif de la diversité génétique sur la survie des populations n'est pas uniquement due au meilleur potentiel adaptatif qu'elle leur confère (Frankham, 2005). En effet, la diversité génétique au niveau individuel, se traduisant par l'état hétérozygote ou homozygote pour un marqueur moléculaire donné ou pour un ensemble de marqueurs, peut directement affecter la valeur sélective des individus. Lorsque le génome est majoritairement à l'état homozygote (par exemple à cause de croisements entre individus apparentés), on peut assister à une baisse drastique de la valeur sélective de l'individu : c'est le phénomène de dépression de consanguinité (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Si ce phénomène est généralisé à l'ensemble des individus au sein d'une population, alors la valeur sélective globale est fortement réduite et la population se dirige vers l'extinction (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Keller & Waller, 2002; Frankham, 2005). Pour autant, une diminution extrême de la valeur sélective n'est pas forcément nécessaire pour observer un impact de l'hétérozygotie. De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence des corrélations positives entre hétérozygotie et des traits de fitness pouvant impacter la valeur sélective (HFC*, *Heterozygosity-Fitness Correlations*) dans des populations viables (Hansson & Westerberg, 2002).

Divers traits phénotypiques, tels que le succès reproducteur (Slate *et al.*, 2000; Hoglund *et al.*, 2002), l'immunocompétence (MacDougall-Shackleton *et al.*, 2005; Whitehorn *et al.*, 2011; Kaunisto *et al.*, 2013), la survie (Rossiter *et al.*, 2001; Markert *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2006) ou la croissance (Rowe, 1994; Huo *et al.*, 2017) présentent une association significative avec l'hétérozygotie des individus (pour revue : (Coltman & Slate, 2003; Reed & Frankham, 2003a; Kempenaers, 2007; Chapman *et al.*, 2009). La meilleure qualité génétique* des hétérozygotes concerne un très grand

nombre de taxa puisqu'on retrouve des HFC entre autres chez les vertébrés (Heath *et al.*, 2002; Worley *et al.*, 2010; Shaner *et al.*, 2013), les mollusques (Bierne *et al.*, 1998; Price & Hadfield, 2014), les arthropodes (Weeks *et al.*, 2009) mais aussi chez les plantes (Fischer & Matthies, 1998).

2) Bases génétiques de la dépression de consanguinité

L'homozygotie accrue peut conduire à une baisse de valeur sélective de deux façons différentes (Charlesworth & Willis, 2009; Szulkin *et al.*, 2010). (i) Tout d'abord, l'existence d'allèles délétères récessifs peut contribuer à diminuer la valeur sélective d'un individu. Dans ce cas de figure, la valeur sélective d'un hétérozygote est proche de celle d'un homozygote pour l'allèle dominant, et supérieure à celle d'un homozygote pour l'allèle récessif. Ce phénomène, appelé « dominance directionnelle », est considéré comme le principal responsable de la dépression de consanguinité (Crow, 2008). (ii) Une autre possibilité est l'existence d'un avantage hétérozygote, pour lequel un individu hétérozygote possède une valeur sélective supérieure à celle des deux homozygotes. Cette situation est appelée *overdominance*, mais son rôle dans la dépression de consanguinité est vraisemblablement marginal (Crow, 2008).

3) Trois hypothèses principales pour expliquer les HFC

Diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes responsables des corrélations entre valeur sélective et hétérozygotie mesurée pour un certain nombre de marqueurs. Si la démocratisation de marqueurs moléculaires sélectivement neutres a permis d'en favoriser certaines, la communauté scientifique n'est à ce jour toujours pas parvenue à un consensus (David, 1998; Balloux *et al.*, 2004; Szulkin *et al.*, 2010). Trois hypothèses principales sont donc avancées (Hansson & Westerberg, 2002) :

(1) L'hypothèse de l'**effet direct** (*direct effect hypothesis*): les HFC résulteraient directement de l'expression d'un locus génotypé dans l'étude. Cette situation nécessite forcément

l'utilisation de marqueurs fonctionnels, et constitue une hypothèse privilégiée concernant les études sur les allozymes réalisées dans la dernière moitié du XX^{ème} siècle (Singh & Zouros, 1978; Diehl & Biesiot, 1994). Dans ce cas, une différence de propriétés catalytiques entre les différents allèles enzymatiques confèrerait aux hétérozygotes un système métabolique plus performant, l'avantage sélectif des hétérozygotes résultant ainsi d'un phénomène d' *overdominance* (Hansson & Westerberg, 2002). De nos jours, ce type de marqueur est tombé en désuétude et l'hypothèse de l'effet direct ne peut pas être appliquée aux marqueurs microsatellites* désormais majoritairement utilisés et considérés comme sélectivement neutres. Toutefois, les marqueurs du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH*) couramment utilisés chez les vertébrés pourraient donner lieu à des HFC expliquées par un effet direct du locus sur la valeur sélective (Worley *et al.*, 2010).

(2) L'hypothèse de l'**effet local** (*local effect hypothesis*) : dans ce cas de figure, les HFC résulteraient de l'expression d'un locus fonctionnel à l'état hétérozygote situé à proximité d'un marqueur génotypé dans l'étude, lui aussi à l'état hétérozygote par un phénomène de déséquilibre de liaison. Ce type de situation est généré par des évènements récents de dérive génétique, migration ou sélection (Slate & Pemberton, 2007), à l'origine de l'association non aléatoire des allèles entre loci dans les gamètes. Les déséquilibres de liaison diminuent au fil des générations en raison de la recombinaison mais perdurent plus longtemps entre les loci physiquement proches. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence des HFC résultant de l'hétérozygotie pour un marqueur précis (Da Silva *et al.*, 2006; Minias *et al.*, 2015).

(3) L'hypothèse de l'**effet général** (*general effect hypothesis*): ici, l'hétérozygotie aux loci fonctionnels responsables de la valeur sélective serait corrélée à l'hétérozygotie du génome dans son ensemble, ce qui inclut les marqueurs génotypés. Cette situation de corrélation d'hétérozygotie entre loci est appelée déséquilibre d'identité, et peut notamment être vérifiée au sein des marqueurs moléculaires génotypés (Szulkin *et al.*, 2010; Stoffel *et al.*,

2016). Cette hypothèse d'effet général a notamment été suggérée pour des études sur les oiseaux (Hemmings *et al.*, 2012) ou les mammifères (Annavi *et al.*, 2014).

Les hypothèses d'effet local et général, c'est-à-dire les seules permettant d'expliquer les HFC observées pour des marqueurs neutres, font appel à la notion *d'overdominance* associative (Bierne *et al.*, 2000; Szulkin *et al.*, 2010) : les individus hétérozygotes pour les marqueurs génotypés présentent une meilleure valeur sélective que les individus homozygotes, en raison d'une association statistique avec les loci sous sélection. La part de ces deux hypothèses dans l'explication des HFC est encore aujourd'hui débattue. Certains auteurs soutiennent en effet que l'hétérozygotie pour une poignée de marqueurs génotypés ne peut pas représenter le coefficient de consanguinité dans de grandes populations panmictiques (Balloux *et al.*, 2004), rendant improbable la présence d'un déséquilibre d'identité. En raison de cela, les HFC ne pourraient être expliquées que par un effet local causé par une liaison physique entre loci de valeur sélective et marqueurs moléculaires génotypés. Cette vision est cependant contestée par d'autres auteurs, notamment Szulkin *et al.* (2010) qui soulignent que dans les systèmes naturels, les populations ne remplissent pas forcément les critères de grande taille et panmixie. Ainsi, les populations naturelles peuvent tout de même présenter une certaine variation de consanguinité *sensu lato*, que ce soit avec la présence de quelques appariements consanguins dans la population, mais aussi à cause d'évènements de dérive génétique, de goulot d'étranglement ou de brassage génétique (*genetic admixture*). Ces mécanismes seraient suffisants pour générer un déséquilibre d'identité au sein du génome et pourraient rendre possible la détection de HFC par un effet général (**Figure 1**).

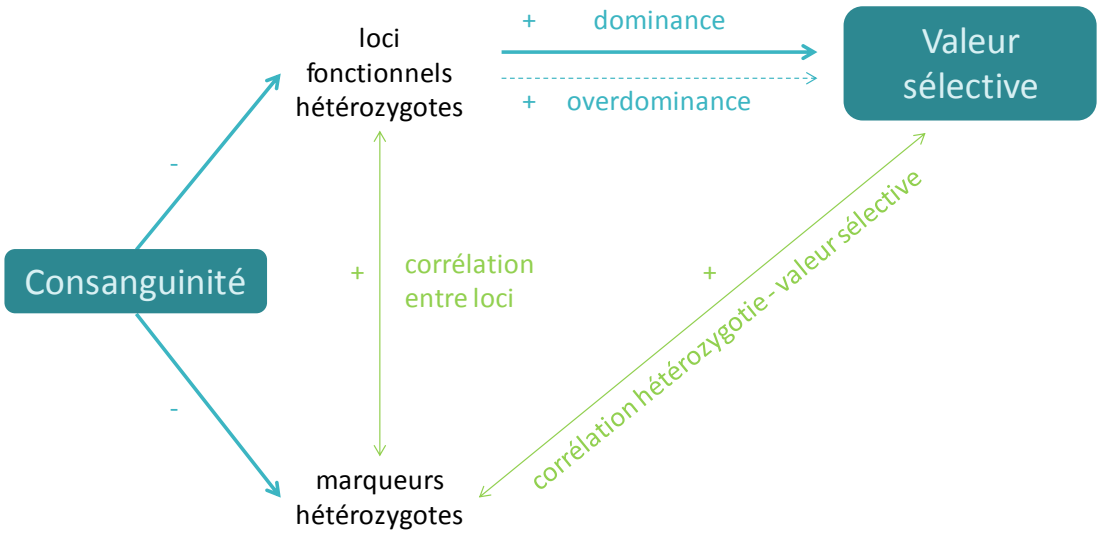

Figure 1 Effet de la consanguinité (au sens large) sur l'hétérozygotie du génome et la valeur sélective des individus selon l'hypothèse de l'effet général. Les flèches vertes représentent une corrélation statistique, les flèches bleues une relation causale, la flèche en pointillés indique un effet présumé faible. Adapté de Szulkin *et al.* (2010).

B. D'où provient la diversité génétique ?

I. Mécanismes générateurs de diversité

Différents mécanismes peuvent être à l'origine de nouveaux allèles (Futuyma, 2013). La mutation permet de générer *de novo* de nouvelles séquences nucléotidiques, suite à des erreurs lors de la réplication et la réparation de l'ADN. Il peut ainsi s'agir de polymorphismes sur une seule paire de bases (SNP*, *Single Nucleotide Polymorphism*) suite à une modification nucléotidique ponctuelle. L'insertion ou la délétion de séquences longues de plusieurs paires de bases conduisent également à l'émergence de nouveaux allèles. En particulier, les variations de longueur des marqueurs microsatellites sont le résultat d'erreurs réalisées par la polymérase en répliquant l'ADN, ce qui conduit à l'apparition d'allèles via l'augmentation ou la diminution du nombre de répétitions. Lorsque les mutations apparaissent dans les lignées cellulaires germinales, elles sont transmises aux générations suivantes et contribuent ainsi à l'apparition de nouveaux allèles au sein d'une population.

Une autre possibilité de génération de diversité génétique est l'importation de nouveaux allèles trouvant leur origine en dehors de la population. Ainsi, la migration et plus généralement les flux génétiques inter-populationnels permettent l'introduction d'allèles jusqu'ici absents du pool génétique

de la population. Par ailleurs, l'intégration de matériel génétique provenant d'autres espèces via un transfert horizontal est aussi à l'origine d'innovations dans le génome (Keeling, 2009; Peccoud *et al.*, 2017), même si l'impact des transferts horizontaux de gènes sur le polymorphisme dans les populations reste à déterminer.

Enfin, la reproduction sexuée est un moyen de générer de la diversité au niveau génotypique. La méiose permet en effet un réarrangement des combinaisons d'allèles au sein des gamètes, conduisant à de nouveaux assemblages d'allèles au sein des descendants. Cette propriété de la méiose est l'une des hypothèses permettant d'expliquer l'évolution et le maintien de la reproduction sexuée dans le monde vivant, malgré le fait que cette reproduction sexuée soit plus coûteuse à maintenir que ne l'est la multiplication asexuée (Burt, 2000).

II. Mécanismes de maintien de la diversité génétique

1) Maintien de la richesse allélique

Le maintien du polymorphisme généré par les mécanismes que nous venons de citer est principalement déterminé par l'effet des différents allèles sur la valeur sélective de l'organisme. Ainsi, des allèles délétères pour l'organisme sont généralement contre-sélectionnées par sélection naturelle, et leur fréquence dans les populations reste relativement basse, voire nulle, en particulier dans les populations à reproduction sexuée (où la purge des allèles délétères est également une hypothèse de maintien du sexe). La fréquence des allèles apportant un bénéfice en termes de valeur sélective devrait quant à elle augmenter dans ces populations. Toutefois, une proportion importante des mutations n'a pas d'effet sur la valeur sélective des organismes (Kimura, 1968). D'après la théorie neutraliste de l'évolution (Kimura, 1968), la fréquence de ces allèles sélectivement neutres fluctue d'une génération à l'autre en fonction de paramètres stochastiques tels que la dérive génétique (Wright, 1931). Bien entendu, la localisation des loci les uns par rapport aux autres au sein du génome peut également influencer la persistance des allèles au cours des générations, des pressions de sélection s'appliquant sur des loci proches pouvant jouer sur la persistance des nouveaux allèles (Charlesworth *et al.*, 1993).

2) Maintien de l'hétérozygotie

Chez les organismes à reproduction sexuée, les génotypes des individus dépendent de la façon dont s'associent les allèles suite à l'union des gamètes. Sous les conditions de l'équilibre de Hardy-Weinberg, les fréquences alléliques et génotypiques, y compris celles des hétérozygotes, sont en équilibre d'une génération à l'autre. Plus précisément, elles sont déterminées par la fréquence des allèles dans une population idéale, sans intervention de forces micro-évolutives telles que les mutations, les migrations, la sélection (naturelle et/ou sexuelle) ou la dérive génétique. Cependant, les conditions de cet équilibre ne sont pas toujours remplies en populations naturelles, notamment l'absence de sélection. En particulier, la sélection naturelle peut conditionner les fréquences génotypiques. Les homozygotes peuvent ainsi avoir une valeur sélective plus faible ou les hétérozygotes une valeur sélective plus forte, pour les raisons que nous avons déjà mentionnées précédemment. On peut ainsi observer des variations dans les fréquences génotypiques dans les populations au fil du temps (Bierne *et al.*, 1998; Andras, 2017). Un autre mécanisme influent complémentaire est la sélection sexuelle. En effet, les organismes peuvent choisir de s'apparier avec des partenaires selon leur génotype, et la compétition pour l'accès aux partenaires du sexe opposé peut favoriser le succès de certains génotypes (Kempenaers, 2007). La fréquence des génotypes de la génération suivante peut ainsi en être impactée, et notamment celle des hétérozygotes. Ces phénomènes sont largement étudiés et un grand pan de la littérature scientifique concerne l'impact de la diversité génétique individuelle sur la sélection sexuelle, ainsi que les conséquences de cette sélection sur le génotype de la génération suivante.

C. Sélection sexuelle et diversité génétique individuelle

I. Hétérozygotie et compétition intra-sexuelle pour l'accès aux partenaires

L'hétérozygotie des individus peut être déterminante dans la compétition entre les individus du même sexe pour l'accès aux partenaires sexuels. En effet, les plus hétérozygotes peuvent être plus performants pour des traits liés aux capacités compétitrices des organismes (voir Kempenaers (2007) pour revue). Chez certaines espèces, les individus les plus hétérozygotes possèdent un meilleur statut social, par exemple parce qu'ils sont plus agressifs (Tiira *et al.*, 2003). Chez le tétra lyre *Tetrao tetrix*, espèce formant des leks, les mâles les plus hétérozygotes ont plus de chances d'obtenir un territoire au cours de leur vie, et ce territoire a plus de chances d'être de bonne qualité (Hoglund *et al.*, 2002). Cela se traduit par un plus grand nombre de copulations au cours de la vie pour les mâles tétra lyre les plus hétérozygotes. De plus, l'hétérozygotie peut être corrélée au développement des ornements mâles, comme chez la mésange bleue *Cyanistes caeruleus* où les mâles les plus hétérozygotes présentent un plumage reflétant plus les ultraviolets, ce trait étant un signal sexuel secondaire chez cette espèce (Foerster *et al.*, 2003). Enfin, les mâles les plus hétérozygotes peuvent produire des spermatozoïdes de meilleure qualité comme chez le lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* (Gage *et al.*, 2006), ou plus nombreux comme chez le branchiopode *Eulimnadia texana* (Weeks *et al.*, 2009). De tels mâles sont ainsi susceptibles d'êtres avantagés au cours de la compétition spermatique ayant lieu lorsque plusieurs spermatozoïdes entrent en compétition pour un ovocyte.

II. Choix du partenaire sexuel

1) Caractéristiques génétiques sous sélection et impact sur la diversité génétique des populations

Il convient de distinguer deux types de choix de partenaire : le choix pour des bénéfices directs et celui pour des bénéfices indirects (Andersson & Iwasa, 1996). Les bénéfices directs consistent en un

avantage de valeur sélective pour l'individu qui choisit ou pour sa descendance via de meilleures ressources apportées par l'individu choisi (Møller & Jennions, 2001). Ces ressources peuvent être de différentes natures comme un territoire, un apport énergétique comme de la nourriture ou des soins aux jeunes. Les bénéfices indirects, aussi appelés bénéfices génétiques, concernent toute augmentation de la qualité génétique des descendants.

Plusieurs théories ont mis en évidence la place occupée par les caractéristiques génétiques dans le choix de partenaire. Ainsi, selon la théorie des bons gènes, les individus sont choisis sur la base de traits phénotypiques traduisant la présence d'allèles leur conférant une meilleure qualité, telle que la survie ou le succès reproducteur, qui pourront être transmis de manière héréditaire à leur descendance (Fisher, 1915; Garcia-Gonzalez & Simmons, 2011). C'est notamment le cas dans la théorie de l'emballement Fisherien, selon laquelle la présence d'ornements exagérés chez un sexe co-évolue avec la préférence de l'autre sexe pour ce trait extravagant n'apportant pas plus qu'une meilleure attractivité sexuelle (Fisher, 1930). L'hypothèse du handicap de Zahavi, quant à elle, postule que les traits attractifs sont coûteux, et constituent ainsi un signal honnête reflétant la bonne qualité de l'individu qui réussit à les exprimer (Zahavi, 1975). Dans cette situation, le choix pour les bons gènes est conditionné par la possession d'allèles spécifiques, indépendamment du reste du génome. Cela implique qu'un individu est intrinsèquement un « bon » ou « mauvais partenaire », et que la préférence pour le « meilleur partenaire » est la même pour tous les individus effectuant un choix. Ce processus résulte alors en une sélection directionnelle pour le trait considéré, et tend vers une réduction de la diversité génétique, ce qui a longtemps posé la question de savoir comment les variations pour le trait et le choix pouvaient persister dans les populations (Kempenaers, 2007).

En 1982, Hamilton & Zuk (1982) ont proposé l'hypothèse selon laquelle les traits secondaires représenteraient la capacité des individus à résister contre des parasites. En raison de la perpétuelle course aux armements entre hôte et parasite, la fréquence des allèles conférant une résistance devraient évoluer de façon cyclique au cours des générations, permettant à la variabilité génétique d'être maintenue dans les populations. C'est dans les années 1990 que sont apparues des théories alternatives permettant d'expliquer le maintien de la diversité génétique (Kempenaers, 2007). En particulier, la

théorie de l'hétérozygotie de Brown (1997) apporte deux idées nouvelles : (i) le statut de « meilleur partenaire » peut être conféré à un individu par l'état hétérozygote de son génotype, et non par la possession d'un allèle en particulier ; et (ii) il n'existe d'ailleurs pas forcément de « meilleur partenaire », car la valeur sélective des descendants peut dépendre de l'interaction entre les génotypes des deux parents. Dans ce dernier cas, le choix s'effectue généralement pour un partenaire dont le génotype est différent de celui qui choisit (i.e. pour un partenaire génétiquement dissimilaire), de façon à augmenter l'hétérozygotie des descendants (Zeh & Zeh, 1997; Tregenza & Wedell, 2000). Cependant, sous certaines conditions, choisir un partenaire hétérozygote peut également contribuer à augmenter l'hétérozygotie des descendants (Fromhage *et al.*, 2009). Ces deux possibilités (choix pour un partenaire génétiquement dissimilaire ou hétérozygote) conduisent à un maintien de la diversité génétique au cours des générations, et sont détaillés ci-après.

2) Choix pour un partenaire génétiquement dissimilaire

Le choix pour un partenaire génétiquement dissimilaire, aussi appelé choix pour la compatibilité génétique, est abondamment décrit et discuté dans la littérature (Pusey & Wolf, 1996; Zeh & Zeh, 1996, 1997; Tregenza & Wedell, 2000; Neff & Pitcher, 2005; Kempenaers, 2007). De ce fait, suite à la reproduction entre des partenaires possédant des allèles différents, dits « compatibles », les descendants présentent une hétérozygotie accrue et ont donc potentiellement une meilleure valeur sélective en raison des mécanismes décrits dans la première partie de cette introduction. Souvent, les couples génétiquement dissimilaires ont une meilleure fertilité* que les couples similaires (Vega-Trejo *et al.*, 2015; Müller & Müller, 2016). Un choix pour des partenaires génétiquement dissimilaires a ainsi été observé chez de nombreuses espèces de vertébrés, tels que des poissons (Geßner *et al.*, 2017), des amphibiens (Rovelli *et al.*, 2015), des lézards (Olsson *et al.*, 2003), des oiseaux (Freeman-Gallant *et al.*, 2003) ou des mammifères (Hoffman *et al.*, 2007; Cohas *et al.*, 2008). En comparaison, relativement peu de travaux ont été effectués chez les invertébrés (Beltran *et al.*, 2008).

Les études que nous venons de citer en exemple utilisent des coefficients de similarité au sein de paires d'individus (*pairwise genetic relatedness*) basés sur leur génotype pour des marqueurs moléculaires donnés (microsatellites, CMH ou SNP). Ces coefficients peuvent être corrigés par la fréquence des allèles au sein d'une population, comme le très répandu coefficient de Wang (2002) par exemple. Cependant, de nombreuses études utilisent des croisements contrôlés afin de manipuler le degré de parenté entre les individus plutôt que de mesurer leur similarité génétique, des individus partageant un ancêtre commun ayant une plus forte probabilité de partager des allèles que des individus non apparentés. Les descendants de couples apparentés, dits consanguins, ont alors une forte probabilité d'être homozygotes. Dans ces protocoles, les individus sont classiquement testés pour un choix entre des individus non apparentés et des frères/sœurs. Ainsi, l'évitement de la reproduction avec des individus apparentés est considéré comme un cas particulier du choix pour la compatibilité génétique. En effet, les allèles délétères étant généralement présents à une faible fréquence dans les populations, c'est chez les individus consanguins qu'ils risquent le plus de se trouver à l'état homozygote et donc d'avoir des conséquences importantes sur la valeur sélective de l'organisme (Tregenza & Wedell, 2000). L'évitement de consanguinité a ainsi été observé chez le campagnol roussâtre *Myodes glareolus* (Lemaitre *et al.*, 2012), chez la souris *Mus musculus* (Firman & Simmons, 2015), chez le coq Bankiva *Gallus gallus* (Lovlie *et al.*, 2013) mais également chez quelques insectes comme la pyrale *Plodia interpunctella* (Lewis & Wedell, 2009), le grillon provençal *Gryllus bimaculatus* (Bretman *et al.*, 2004) ou la blatte *Blatella germanica* (Lihoreau *et al.*, 2008).

3) Choix pour un partenaire hétérozygote

Un partenaire peut également être choisi parce qu'il est hétérozygote (Kempenaers, 2007; Lehmann *et al.*, 2007; Fromhage *et al.*, 2009). Différents travaux attestent en effet d'un choix préférentiel envers des individus hétérozygotes, notamment chez le lézard vivipare *Zootoca vivipara* (Laloi *et al.*, 2011), chez des mammifères comme l'otarie de Kerguelen *Arctocephalus gazella* (Hoffman *et al.*, 2007) et la souris *Mus musculus* (Ilmonen *et al.*, 2009), chez des oiseaux tels que le

manakin filifère *Pipra filicauda* (Ryder *et al.*, 2010) et le mahali à sourcils blancs *Plocepasser mahali* (Harrison *et al.*, 2013) ainsi que chez le nécrophore *Nicrophorus vespilloides* (Pilakouta & Smiseth, 2017). Là encore, les méthodes pour tester ces hypothèses reposent soit sur des coefficients d'hétérozygotie basés sur la présence de différents allèles aux loci génotypés (Hoffman *et al.*, 2007), ou bien sur l'utilisation d'individus plus ou moins consanguins (donc plus ou moins homozygotes) issus de croisements contrôlés (Pilakouta & Smiseth, 2017).

Deux hypothèses permettent d'expliquer le choix pour les individus les plus hétérozygotes (Kempenaers, 2007). Tout d'abord, ils pourraient apporter des bénéfices directs de par leur meilleure qualité. Par exemple, les mâles les plus hétérozygotes ont des descendants qui survivent mieux chez le bruant chanteur *Melospiza melodia* (Marr *et al.*, 2006), potentiellement suite à un meilleur soin parental (Kempenaers, 2007) ce qui peut constituer un bénéfice direct pour les individus choisissant de tels partenaires. Une autre possibilité est l'apport de bénéfices indirects de la part des hétérozygotes, c'est-à-dire une optimisation de l'hétérozygotie des descendants. Les descendants bénéficieraient alors d'une meilleure valeur sélective résultant de HFC. En particulier, des modèles mathématiques ont permis de montrer qu'un choix pour des ornements liés à l'hétérozygotie pourrait se maintenir dans les populations (Lehmann *et al.*, 2007), et ce dans une large gamme de conditions comme l'existence d'un coût pour le choix ou des variations stochastiques dans le lien entre hétérozygotie et ornements (Fromhage *et al.*, 2009). En revanche, cette situation n'est possible que sous l'hypothèse de transmission de l'hétérozygotie des parents aux descendants.

III. Héritabilité de l'hétérozygotie

Bien que l'hétérozygotie ne soit pas héritable selon certains auteurs (Kempenaers, 2007; Coulson & Clegg, 2014), des corrélations entre l'hétérozygotie des parents et celle de leurs descendants ont été relevées chez divers organismes (Richardson *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2007; Garcia-Navas *et al.*, 2009). Dès 1993, les travaux théoriques de Mitton *et al.* (1993) ont démontré que, pour un locus bi-allélique, la corrélation d'hétérozygotie entre parents et descendants est nulle lorsque

les fréquences alléliques sont équilibrées, mais tend vers un maximum de r = 0,5 lorsqu'elles sont hautement biaisées. Mitton *et al.* (1993) ont complété leurs simulations par l'analyse de jeux de données chez le pin *Pinus flexilis* et différentes lignées de chevaux *Equus caballus*, ce qui leur a permis de confirmer l'héritabilité de l'hétérozygotie avec une magnitude prévue par leurs prédictions. Récemment, Nietlisbach & Hadfield (2015) ont étendu ce cadre théorique à un locus multi-allélique, situation dans laquelle sont de nombreux loci impliqués dans la valeur sélective. Ils sont ainsi parvenus aux mêmes conclusions que Mitton *et al.* (1993), à savoir une héritabilité de l'hétérozygotie augmentant avec un biais de fréquences alléliques. Ils ont également montré que l'héritabilité de l'hétérozygotie était moindre en cas de consanguinité. Ainsi, une optimisation de l'hétérozygotie des descendants pourrait résulter d'un choix pour les partenaires hétérozygotes (que ce soit pour des bénéfices directs ou indirects), mais pourrait également être une conséquence du succès des plus hétérozygotes dans la compétition pour l'accès aux partenaires sexuels. L'ensemble des processus de sélection sexuelle impliquant les caractéristiques génétiques des reproducteurs et leur effet sur l'hétérozygotie des descendants est récapitulé en **Figure 2**.

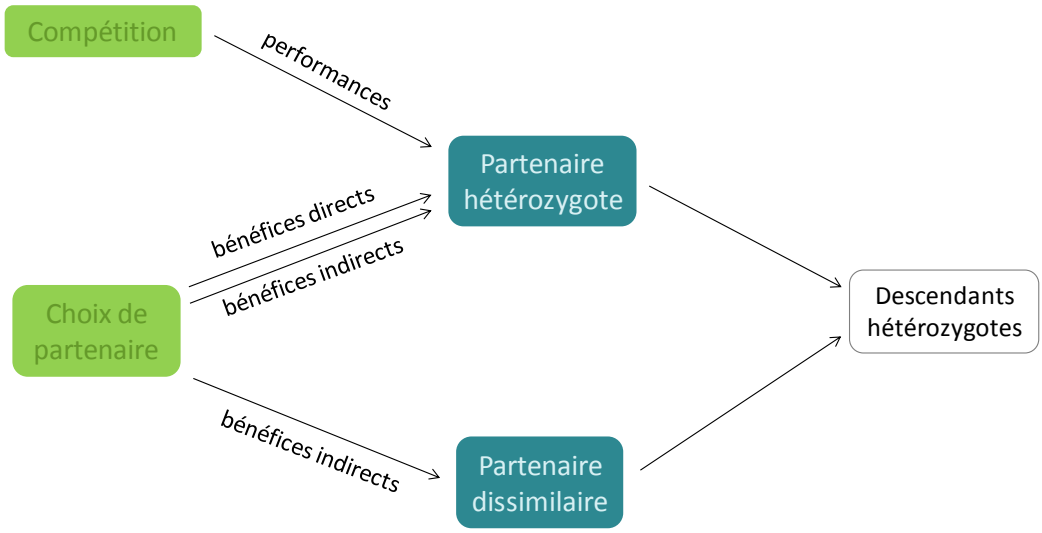

Figure 2 Effet des différentes composantes de la sélection sexuelle (en vert) sur les caractéristiques génétiques des partenaires sexuels (en bleu), pouvant aboutir à une augmentation de l'hétérozygotie des descendants.

IV. Importance de l'appariement multiple femelle dans la sélection pour les caractéristiques génétiques

L'appariement multiple des femelles a longtemps été un mystère évolutif : en effet, les travaux de Bateman (1948) sur la drosophile *Drosophila melanogaster* ont montré que contrairement aux mâles, le nombre de descendants n'augmentait pas avec le nombre de partenaires chez les femelles. Le comportement d'appariement multiple femelle est pourtant extrêmement répandu chez les vertébrés (Boonstra *et al.*, 1993; Zane *et al.*, 1999; Neff & Pitcher, 2002; Aguilera-Reyes *et al.*, 2006; Zbinden *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2012) ainsi que les invertébrés (Tregenza & Wedell, 1998; Walker *et al.*, 2002; Yue & Chang, 2010; Soper *et al.*, 2012; Mongue *et al.*, 2015). Différents systèmes d'appariement sont ainsi concernés par un comportement d'appariement multiple des femelles : chez les espèces monogames*, les femelles peuvent effectuer des copulations hors-couple aboutissant à la production de descendants, en particulier chez les oiseaux (Freeman-Gallant *et al.*, 2003; Dunn *et al.*, 2013) ou les mammifères (Cohas *et al.*, 2007) ; par ailleurs, les systèmes d'appariement polyandres* et promiscuitaires* sont définis entre autres par l'accouplement des femelles avec plusieurs mâles, et concernent diverses espèces de vertébrés (Pizzari & Birkhead, 2000; Lyons *et al.*, 2017) et invertébrés (Tregenza & Wedell, 1998; McCullough *et al.*, 2017). La forte fréquence de ce comportement est d'autant plus troublante qu'il augmente les coûts liés à l'accouplement, tels que des risques d'infection ou de prédation accrus. L'existence de bénéfices permettant de compenser ces coûts devrait alors permettre l'évolution et le maintien de ces accouplements multiples.

Diverses hypothèses ont été avancées pour proposer de tels bénéfices (Reynolds, 1996; Zeh & Zeh, 1996, 1997; Jennions & Petrie, 2000; Simmons, 2005). Tout d'abord, les appariements multiples pourraient permettre aux femelles de cumuler certains bénéfices directs, comme par exemple les nutriments à travers les spermatophores offerts par les mâles à chaque accouplement chez les sauterelles (Gwynne, 2008). D'autre part, des bénéfices indirects pourraient également être obtenus, à la condition que les appariements multiples se fassent avec des mâles différents. Les femelles chercheraient ainsi à augmenter la transmission de bons gènes à leurs descendants, par exemple suite à un premier accouplement avec un mâle de mauvaise qualité génétique (hypothèse de *trade-*

up génétique) (Yasui, 1998). D'autre part, les femelles pourraient augmenter la richesse allélique au sein de la portée en multipliant les partenaires sexuels (Yasui, 1998). Elles bénéficieraient alors d'une portée avec de meilleures capacités d'adaptation face à des pressions biotiques ou abiotiques. Cette situation est illustrée par le bourdon *Bombus terrestris*, chez qui les colonies issues de reines polyandres présentent un taux de parasitisme moindre et un meilleur succès reproducteur que les colonies issues de reines monoandres (Baer & Schmid-Hempel, 1999). Enfin, une dernière hypothèse concernant les bénéfices indirects et ayant reçu une attention particulière au cours des deux dernières décennies est l'accouplement multiple pour optimiser l'hétérozygotie des descendants (Zeh & Zeh, 1996, 1997; Jennions & Petrie, 2000; Simmons, 2005).

Selon cette dernière hypothèse, les femelles peuvent choisir de s'accoupler avec un mâle supplémentaire si le(s) premier(s) n'étai(en)t pas assez hétérozygote(s) ou compatible(s). C'est notamment le cas chez certains oiseaux comme le manakin filière *Pipra filicauda* (Ryder *et al.*, 2010) ou le roselin cramoisi *Carpodacus erythrinus* (Winternitz *et al.*, 2015), où les mâles hors-couple auprès desquels les femelles sollicitent des accouplements supplémentaires peuvent être plus hétérozygotes que le partenaire social, comportement ayant été démontré comme contribuant à l'augmentation de l'hétérozygotie des portées chez la mésange bleue *Parus caeruleus* (Foerster *et al.*, 2003). Même si le choix d'un partenaire hors-couple semble être rarement effectué pour un partenaire génétiquement plus dissimilaire que le mâle social (Cohas, 2005; Fossøy *et al.*, 2009), il est à noter que chez le trématode monogame *Schistosoma mansoni*, on observe un taux de changement de partenaire plus important lorsque les femelles ont l'opportunité de choisir un nouveau partenaire leur étant plus dissimilaire génétiquement que leur partenaire initial (Beltran *et al.*, 2008).

Les femelles peuvent également s'accoupler avec plusieurs mâles de sorte que la paternité soit biaisée envers les mâles dont les spermatozoïdes sont sélectionnés à travers des processus post-copulatoires, comme la compétition spermatique ou le choix cryptique (Tregenza & Wedell, 2000). Ainsi, le taux d'éclosion est souvent meilleur chez les femelles ayant pu s'accoupler à la fois avec des mâles similaires et dissimilaires, comparé à des femelles accouplées avec des mâles similaires uniquement. Ceci est généralement interprété comme un choix cryptique de la femelle consistant en un

biais de fécondation en faveur des mâles les moins similaires génétiquement. Ce cas de figure est observé notamment chez le lézard *Lacerta agilis* (Olsson *et al.*, 1996), le guppy *Poecilia reticulata* (Fitzpatrick & Evans, 2014) mais aussi chez le grillon provençal *Gryllus bimaculatus* (Tregenza & Wedell, 2002) ou l'araignée *Oedothorax apicatus* (Bilde *et al.*, 2007). Des biais de paternité peuvent être aussi observés en faveur des mâles les plus hétérozygotes comme chez la gambusie *Gambusia holbrooki* (Marsh *et al.*, 2017). Bien qu'il soit possible que de tels biais résultent d'un choix cryptique de la femelle, l'hypothèse retenue dans ce cas est celle d'une meilleure performance des mâles hétérozygotes dans la compétition spermatique, comme chez le diamant mandarin *Taeniopygia guttata* où les mâles produisent des spermatozoïdes plus véloces et dont la pièce médiane est plus longue (Knief *et al.*, 2017) s'il sont hétérozygotes pour un locus situé sur un chromosome sexuel (les mâles étant homogamétiques chez les oiseaux).

D.Qu'en est-il chez le cloporte *Armadillidium vulgare*?

Le présent manuscrit se propose de rechercher un effet de la diversité génétique individuelle sur différents aspects de la biologie du cloporte commun *Armadillidium vulgare* (**Figure 3**), à savoir les processus de sélection sexuelle ainsi que différents traits liés à la valeur sélective des animaux.

Figure 3 Quelques individus *Armadillidium vulgare* élevés en laboratoire, sur une des feuilles de tilleul dont ils se nourissent.

Cet isopode terrestre est en effet un modèle adapté pour répondre à de telles questions, d'une part parce qu'il présente une importante diversité génétique (**encadré 1**), mais également parce que le choix de partenaire de façon générale peut être attendu chez *A. vulgare*. En effet, ce crustacé est grégaire (Takeda, 1984) et a ainsi de nombreuses occasions de rencontrer des partenaires sexuels, condition nécessaire à l'évolution à la fois du choix de partenaire et de la compétition entre individus pour accéder à la reproduction. Une préférence de la part des mâles a déjà été montrée envers des femelles réceptives à l'accouplement (Beauché & Richard, 2013), ainsi qu'envers des femelles non infectées par le parasite de la reproduction *Wolbachia* (Moreau *et al.*, 2001). Plus récemment, une préférence mâle pour des femelles vierges a également été mise en évidence (Fortin, 2016). Ces éléments indiquent que les individus mâles *A. vulgare* sont sélectifs au moment de la reproduction et sont capables de discriminer les femelles. En revanche, on ignore tout sur la capacité des femelles à choisir leur partenaire. De plus, jamais la compétition pour l'accès au partenaire ni le choix de partenaire n'ont été étudiés en relation avec les caractéristiques génétiques individuelles chez *A. vulgare*.

La recherche d'un choix parmi deux partenaires sur la base de caractéristiques génétiques (hétérozygotie et similarité génétique au partenaire) fera l'objet du premier chapitre. Ainsi, la préférence mâle sera étudiée à l'aide de test de choix en Y, et des analyses de paternité réalisées sur la descendance de femelles auxquelles deux mâles auront été proposés nous permettront d'accéder au succès reproducteur de chaque mâle, ce protocole autorisant également la compétition mâle-mâle.

L'appariement multiple des femelles fera également l'objet d'une attention particulière en tant que phénomène permettant l'occurrence de sélection post-copulatoire, incluant à la fois le choix femelle cryptique et la compétition spermatique mâle-mâle. Des accouplements avec plusieurs mâles présentés successivement aux femelles ont en effet été observés en laboratoire chez *A. vulgare* (Moreau *et al.*, 2002; Verne *et al.*, 2007b) et la paternité multiple existe en populations naturelles pour d'autres espèces d'isopodes terrestres tels que *Porcellio scaber* (Sassaman, 1978). Les accouplements

***Encadré 1 : Etat des connaissances actuelles sur la diversité génétique chez* Armadillidium vulgare**

Le polymorphisme mitochondrial a fait l'objet d'un intérêt particulier chez *A. vulgare.* En effet, les mitochondries sont transmises maternellement de la même façon que l'endosymbionte *Wolbachia,* largement étudié de par son statut de parasite de la reproduction (Rigaud *et al.*, 1999). Verne *et al.* (2012) ont par exemple mis en évidence une forte structuration mitochondriale corrélée avec l'infection par *Wolbachia* parmi 13 populations situées dans et au nord de la forêt de Chizé, chacune des souches de *Wolbachia* étudiées étant associée exclusivement à un ou plusieurs mitotypes.

La diversité génétique nucléaire a pour l'instant été peu étudiée chez *A. vulgare*, en raison du développement relativement récent des marqueurs microsatellites pour ce modèle (Verne *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 2013). Verne *et al.* (2012) ont mis en évidence une faible structuration génétique nucléaire, indépendante du statut d'infection par *Wolbachia*. Seule une isolation par la distance a été détectée parmi ces populations dispersées sur 97 km. Quoi qu'il en soit, les cinq microsatellites utilisés dans cette étude présentent un polymorphisme relativement élevé (richesse allélique moyenne = 8, hétérozygotie observée moyenne = 0.71) et homogène au sein des populations échantillonnées.

multiples des femelles rendent donc possibles des processus post-copulatoires chez les isopodes terrestres, processus sur lesquels nous n'avons presque aucune connaissance à ce jour, en particulier pour notre modèle biologique (Moreau *et al.*, 2002; Verne *et al.*, 2007b). Par ailleurs, les femelles isopodes terrestres possèdent une spermathèque leur permettant de conserver le sperme de leurs partenaires (Suzuki & Ziegler, 2005; Ziegler & Suzuki, 2011) : ainsi, elles peuvent produire des portées pendant au moins un an suivant une seule insémination chez *A. vulgare* (Howard, 1943). Cette structure pourrait jouer un rôle important dans le choix cryptique mais également dans la compétition spermatique et notamment en lien avec les caractéristiques génétiques des partenaires de la reproduction.

Le deuxième chapitre permettra d'approfondir les connaissances sur l'accouplement multiple chez *A. vulgare*. Nous caractériserons tout d'abord l'ampleur de ce phénomène dans une population naturelle en estimant le nombre de pères dans les portées récoltées, puis nous étudierons l'impact des caractéristiques génétiques individuelles sur le succès reproducteur des mâles et des femelles dans des conditions expérimentales autorisant l'appariement multiple avec un nombre variable de partenaires de chaque sexe.

Bien que les HFC soient répandues chez les eucaryotes, aucune connaissance n'est actuellement disponible à ce sujet chez les isopodes terrestres. Certaines lignées extrêmement consanguines (croisements frère-sœur systématiques) élevées en laboratoire à des fins expérimentales présentent une chute du succès reproducteur au fil des générations (I. Giraud, communication personnelle), suggérant un effet négatif de l'homozygotie accrue sur la valeur sélective. Or, un effet négatif de l'homozygotie (pour des allèles délétères) ou positif de l'hétérozygotie (avantage hétérozygote) est nécessaire pour l'évolution d'un choix de partenaire visant à optimiser l'hétérozygotie des descendants. Il est donc important de caractériser l'effet de l'hétérozygotie sur la valeur sélective de notre modèle d'étude afin de mieux mettre en perspective les résultats obtenus concernant l'impact des caractéristiques génétiques sur la sélection sexuelle.

Le troisième chapitre de ce manuscrit visera à rechercher la présence de HFC chez *A. vulgare.* Différents traits de valeur sélective seront étudiés : nous comparerons d'abord la quantité et la qualité des descendants entre croisements consanguins et non consanguins, puis nous nous focaliserons sur l'évolution des paramètres immunitaires au cours d'une infection par un pathogène en relation avec la diversité génétique individuelle.

Des informations d'ordre général sur notre modèle *A. vulgare*, telles que le cycle de mue par exemple, sont présentées en annexe 1. D'autres informations nécessaires à la bonne compréhension de ce manuscrit sont données ci-après.

Pour répondre à l'ensemble de nos questions, nous utiliserons des marqueurs moléculaires de type microsatellites préalablement développés au laboratoire (Verne *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 2013). Ce type de marqueur est largement utilisé pour estimer l'hétérozygotie des individus, ainsi que la similarité génétique au sein de paires d'individus. Une grande partie de nos approches consistant à estimer le succès reproducteur des individus, les mêmes marqueurs microsatellites seront utilisés pour effectuer des tests de paternité.

La quasi-totalité des travaux présentés dans cette thèse porte sur des animaux vierges issus de la lignée WXa d'*A. vulgare*. Cette lignée a été collectée en 1982 à Helsingör, au Danemark, et a été depuis élevée au laboratoire dans les conditions décrites ci-après. Il s'agit d'une lignée produisant un nombre relativement grand de *pulli* à chaque portée (environ 120), maximisant ainsi nos chances de disposer d'un nombre suffisant d'individus pour nos expériences.

Au laboratoire, les individus sont maintenus à une température constante de 20 ± 1 °C et à la photopériode naturelle de Poitiers (46° 35' N, 0° 20' E) (**Figure 4**). Ils sont placés dans des boites en plastique contenant du terreau humidifié, et nourris *ad libitum* avec des rondelles de carotte fraiche et des feuilles de tilleul sèches réhydratées. Une fois par an, des croisements contrôlés sont réalisés afin de produire la génération suivante. Pour ce faire, les couples reproducteurs sont formés de façon à minimiser les risques de consanguinité. Les individus sont alors isolés par couple au sein de petites boîtes en hiver, c'est-à-dire peu avant la période de reproduction. Ils sont alors placés sous une photopériode contrôlée avec 18 h de lumière et 6 h d'obscurité. Les animaux sont par la suite contrôlés régulièrement afin de pouvoir retirer le mâle dès que la femelle est gravide, pour favoriser le bon développement des petits en retirant une source de stress potentiel pour la mère. Une fois la mise-bas effectuée, la mère est retirée pour éviter le cannibalisme, et ses descendants sont transférés dans une boîte plus spacieuse, favorable à leur croissance. Au bout d'environ trois mois, les descendants

(appelés *pulli*) ne sont pas encore matures sexuellement mais commencent à présenter des caractères permettant de discriminer les mâles des femelles. Ils sont alors triés selon leur sexe et placés dans des boîtes séparées qui constituent leurs boîtes d'élevage définitives. Cette procédure nous permet d'obtenir des animaux vierges dont l'ascendance est connue.

Figure 4 Illustration d'une des salles d'élevages du laboratoire dans lesquelles les lignées contrôlées sont maintenues.

CHAPITRE I : SÉLECTION SEXUELLE POUR LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE, APPROCHE EXPÉRIMENTALE À L'ÉCHELLE INDIVIDUELLE

A.Introduction

I. Rôles des sexes dans la compétition intra- et intersexuelle

La sélection sexuelle pour la diversité génétique, comme pour tout type de trait sous pression de sélection sexuelle, peut s'exercer à différents niveaux (Darwin, 1871). La compétition intra-sexuelle qualifie la lutte entre les individus d'un même sexe pour l'accès aux individus du sexe opposé. Le terme de lutte est ici à prendre au sens large, des interactions entre les compétiteurs n'étant pas nécessairement impliquées. A l'inverse, la compétition intersexuelle concerne la sélectivité d'un sexe pour les partenaires sexuels sur la base de critères particuliers.

Les premières observations sur la sélection sexuelle, en particulier celles de Darwin (1871), ont établi que le sexe femelle est généralement le sexe du choix, tandis que le sexe mâle est le sexe qui entre le plus souvent en compétition pour l'accès aux partenaires sexuels. Cette situation a plus tard été expliquée par le fait que les femelles investissent traditionnellement plus dans la reproduction (Trivers, 1972; Janicke *et al.*, 2016), notamment en résultat de l'anisogamie (Bateman, 1948; Lehtonen *et al.*, 2016). Chez les cloportes en particulier (dont les modalités de reproduction sont présentées dans l'**encadré 2**), les femelles présentent un fort investissement parental. Non seulement elles produisent les ovocytes dans lesquels sont placés d'importantes réserves énergétiques (comme chez l'ensemble des animaux à reproduction sexuée (Hayward & Gillooly, 2011)), mais en outre elles incubent leurs descendants pendant un mois dans leur *marsupium* en leur fournissant les nutriments nécessaires à leur développement (Appel *et al.*, 2011). Les femelles gravides présentent une locomotion réduite par rapport aux femelles non gravides (Kight & Ozga, 2001), ce qui pourrait accroître les risques de prédation et diminuer l'efficacité de l'approvisionnement. De plus, chez les espèces volvationnelles* d'isopodes terrestres telles que *A vulgare,* les sternites s'incurvent vers la cavité générale de la femelle afin de fournir plus de place aux embryons en développement (Appel *et*

Encadré 2 : Modalités de reproduction chez A. vulgare

Anatomie du système reproducteur

L'appareil reproducteur de tous les Oniscidea est pair. Chez les mâles, deux stylets copulateurs permettent d'inséminer les femelles et sont constitués des deux premières paires de pléopodes (**Figure E2.1A**). Chaque stylet copulateur est relié par un canal déférent à une vésicule séminale dans laquelle le sperme s'accumule après sa production dans trois utricules testiculaires (**Figure E2.1C**). Les femelles quant à elles possèdent deux ouvertures génitales situées en face ventrale à la base des péréiopodes du segment 5 (**Figure E2.1B**). Chaque ouverture est reliée à un oviducte aboutissant dans un ovaire disposé longitudinalement dans la cavité générale de l'animal (**Figure E2.1D**). Chez certaines espèces, à la jonction entre l'oviducte et l'ovaire se trouve la spermathèque, aussi appelée réceptacle séminal (Suzuki & Ziegler, 2005; Ziegler & Suzuki, 2011). Chez les femelles s'étant déjà accouplées, cette région renferme un anneau de spermatozoïdes, qui pourront être utilisés pour les portées suivantes pendant au moins un an chez *A. vulgare* (Howard, 1943).

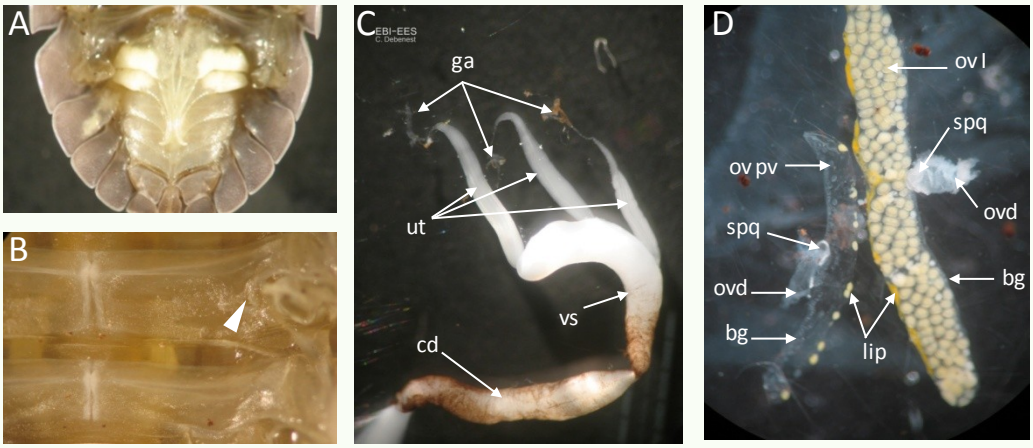

Figure E2.1 Organes génitaux et gonades chez *A. vulgare*. (A) Pléon mâle en vue ventrale, présentant les stylets copulateurs. (B) Sternites 5 et 6 chez une femelle, la pointe de flèche indique l'ouverture génitale gauche (C) Gonade mâle, ga = glandes androgènes, ut = utricules, vs = vésicule séminale, cd = canal déférent. (D) Gonades de deux femelles à différents stades, à gauche en pré-vitellogenèse et à droite en vitellogenèse I (cf. 2. Cycle de reproduction), ov pv = ovocyte en prévitellogenèse, ov I = ovocyte en vitellogenèse I, spq = spermathèque, ovd = oviducte, bg = bande germinative, lip = réserves de lipides. Photographies UMR CNRS 7267.

Cycle de reproduction

Chez les Oniscidea, le cycle de vitellogenèse est étroitement lié au cycle de mue (Steel, 1980) (**Figure E2.2**). Les femelles peuvent ainsi effectuer plusieurs types de mue. (i) Les mues dites

normales, lorsque l'individu n'est pas sexuellement actif, sont des mues de croissance. Lors de l'intermue précédant ce type de mue (intermue normale, en bleu sur la **Figure E2.2**), les ovocytes en pré-vitellogenèse se différencient à partir de la bande germinative présente dans l'ovaire (**Figure E2.1D**). Ensuite, ils commencent à accumuler des réserves : c'est la vitellogenèse primaire. Lors d'une intermue normale, la croissance des ovocytes s'interrompt, et les ovocytes en vitellogenèse primaire sont lysés au moment de l'exuviation. (ii) Les femelles entrent en reproduction au cours d'une intermue pré-parturielle (en orange sur la **Figure E2.2**) précédant une mue parturielle. Ici, les ovocytes ne sont pas lysés mais continuent leur évolution en vitellogenèse secondaire au cours de la période D, où le vitellus remplit le cytoplasme des ovocytes.

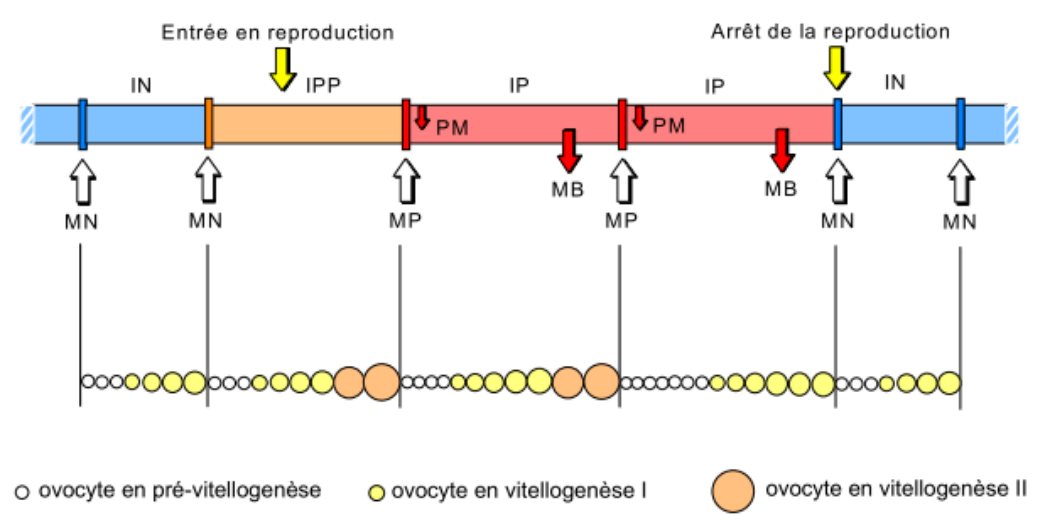

Figure E2.2 Schéma du cycle de mue et lien avec le cycle reproducteur chez les femelles *Armadillidium vulgare*. IN : intermue normale, IPP : intermue préparturielle, IP : intermue parturielle, MN : mue normale, MP : mue parturielle, PM : ponte marsupiale, MB : mise-bas. Tiré de Lefebvre (2002)

Il est possible de déterminer si les femelles vont effectuer une mue parturielle grâce à l'observation des plaques blanches se formant au cours de la pré-mue (**Figure E2.3A et B**, Moreau & Rigaud, 2002). Lors de la mue parturielle, un *marsupium* apparait sur les sternites 1 à 5 (**Figure E2.3C**). Cette poche incubatrice est constituée de feuillets translucides appelés oostegites, fixés à la base des péréiopodes et se chevauchant afin de constituer un milieu propice au développement des embryons (Appel *et al.*, 2011). Cette structure permet ainsi des échanges nutritifs avec la mère et une protection contre la dessiccation.

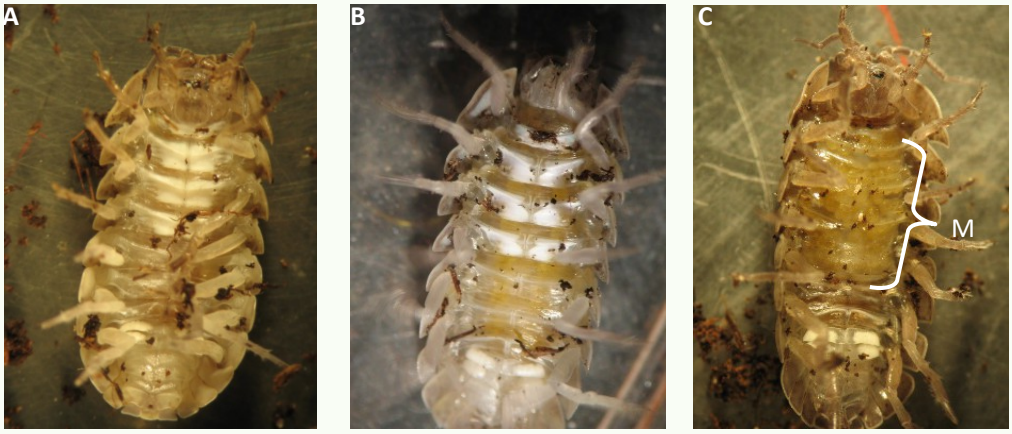

Figure E2.3 Femelles de différents statuts reproducteurs en face ventrale. (A) Fin de période D en intermue normale, les plaques blanches sont rectangulaires et pleines. (B) Fin de période D en intermue pré-parturielle juste avant une mue parturielle, les plaques blanches sont effilées vers l'extérieur du corps et un losange translucide est visible au centre de chaque plaque. (C) Incubation après une mue parturielle, les oostégites translucides laissent entrevoir les œufs ; M = *marsupium.* Photographies UMR CNRS 7267.

Copulation, ponte et mise-bas

L'entrée en reproduction chez les isopodes terrestres est soumise à des conditions environnementales telles que l'augmentation de la température et l'allongement de la photopériode (Mocquard *et al.*, 1989). Ainsi, en France, des femelles reproductrices ont été observées d'avril à octobre (Vandel, 1962), mais la période de reproduction est plus courte à des latitudes plus élevées, comme au Danemark où elle s'étend d'avril à août (Vandel, 1962). Sous nos latitudes, les femelles produisent environ trois portées par an (Vandel, 1962). La copulation a généralement lieu au cours de la période D avant une mue parturielle : à ce moment, les femelles sont à la fois plus réceptives et plus attractives (Beauché & Richard, 2013). La présence de mâles n'est pas nécessaire pour induire ce type de mue chez les femelles même si elle accélère la vitellogenèse (Lefebvre & Caubet, 1999). Les femelles qui ne se sont pas accouplées au cours de la période D d'un cycle préparturiel effectuent tout de même une mue parturielle et déposent des œufs non fécondés dans leur *marsupium* : ce phénomène est appelé ponte blanche.

La séquence copulatoire a été précisément décrite par Mead (1973) : le mâle effectue d'abord des contacts antennaires avec la femelle, puis monte sur son dos et se positionne le long de la femelle en l'agrippant avec ses dernières paires de péréiopodes, pourvues de soies denses lui conférant un meilleur maintien. La femelle peut choisir d'accepter ou non la copulation. En cas de refus, la femelle peut effectuer une volvation et rester dans cette position, empêchant l'insémination. La femelle peut également rester immobile ou essayer de déséquilibrer le mâle, ou tout simplement fuir. Si la femelle

accepte, elle effectue une volvation conduisant au basculement des deux individus sur le côté. La femelle entre-ouvre ensuite son corps, et le mâle peut alors introduire son stylet copulateur dans l'ouverture génitale du côté opposé (e.g. stylet gauche dans l'ouverture droite) afin d'effectuer le transfert de sperme. Le mâle change ensuite de côté pour effectuer la deuxième hémicopulation nécessaire à l'insémination complète de la femelle. Les partenaires se séparent alors. Les femelles sont capables de s'accoupler avec plusieurs mâles au cours d'intermues successives (Verne *et al.*, 2007b), voire d'une même intermue, même si un comportement réfractaire de la femelle diminue la probabilité de ré-accouplement dans les cinq heures suivant un premier accouplement (Moreau *et al.*, 2002).

Immédiatement après l'accouplement, une grande quantité de spermatozoïdes reste stockée dans l'oviducte des femelles. Dans les trois jours qui suivent, une faible proportion des spermatozoïdes quitte l'oviducte pour être transférée dans la spermathèque (Ziegler & Suzuki, 2011). Le processus à l'origine du transfert est encore inconnu : en effet, chez les isopodes, les spermatozoïdes ne sont pas motiles (Cotelli *et al.*, 1976). Une intervention de la femelle est donc fortement soupçonnée, hypothèse supportée par la présence de cellules musculaires pénétrant dans le tissu épithélial de l'oviducte (Ziegler & Suzuki, 2011). Lors de la ponte, intervenant juste après la mue parturielle, les ovocytes quittent l'ovaire en traversant l'anneau de spermatozoïdes d'un diamètre tout juste inférieur à celui des ovocytes (600 µm), causant une désorganisation temporaire de l'anneau. La fécondation a donc probablement lieu au moment du passage de l'ovocyte dans la spermathèque (Ziegler & Suzuki, 2011), et non dans l'oviducte comme cela était communément admis auparavant (Moreau, 2001; Lefebvre, 2002).

L'incubation des jeunes dure environ un mois. Les œufs évoluent dans le *marsupium* en embryons, puis en *mancae* (Surbida & Wright, 2001). Lors de la mise-bas, les oostégites s'ouvrent et les *mancae* en sortent. A ce stade, ils sont complètement dépigmentés à l'exception des yeux, et ne possèdent que six paires de pattes. Une première mue est réalisée dans les 24h après la naissance, marquée par l'apparition de la dernière paire de pattes. Les jeunes sont désormais appelés *pulli*, et commencent à se nourrir (Surbida & Wright, 2001). La maturation sexuelle est complète après la huitième mue chez *A. vulgare*, ce qui correspond à entre 10 et 15 semaines après la naissance selon les conditions d'élevage (Badawi *et al.*, 2015).

al., 2011). Il est possible que ce déplacement comprime les organes et cause une diminution voire un arrêt de nourrissage pour les mères, hypothèse supportée par l'observation d'un tube digestif vide chez les femelles en fin de gravidité (Appel *et al.*, 2011). La reproduction étant assez coûteuse pour les femelles *A. vulgare*, on peut s'attendre à observer un choix de la part des femelles chez cette espèce.

Une inversion des rôles sexuels traditionnels est toutefois observée dans une multitude d'espèces (Trivers, 1972; Cluttonbrock & Vincent, 1991; Kokko *et al.*, 2003). Par exemple, les mâles sont le sexe du choix et les femelles entrent en compétition pour les mâles chez des oiseaux limicoles du genre *Jacana* (Lipshutz, 2017) ou le coucal du Sénégal *Centropus senegalensis* (Andersson, 1995), chez l'araignée *Allocosa senex* (Carballo *et al.*, 2017) ou chez les diptères de la sous-famille des Empidinae (Murray *et al.*, 2017). Divers facteurs peuvent être à l'origine de cette inversion, notamment un investissement mâle plus important dans l'accouplement (Johnson & Hubbell, 1984) ou le soin aux jeunes (Cluttonbrock & Vincent, 1991), ou bien un sex-ratio biaisé en faveur des femelles (Kvarnemo & Ahnesjo, 1996; Kokko & Jennions, 2008; Jennions & Fromhage, 2017; Murray *et al.*, 2017), les mâles devenant le sexe rare. Chez *A. vulgare*, le sex-ratio fluctue largement en populations naturelles, et un biais en faveur des femelles est souvent observé, notamment de par la présence de facteurs féminisants au sein des populations comme la bactérie *Wolbachia* (Verne *et al.*, 2012). Ces conditions sont favorables à l'évolution d'un choix mâle, qui a par ailleurs déjà été observé en faveur des femelles non infectées par *Wolbachia* (Moreau *et al.*, 2001) ainsi qu'en faveur des femelles vierges (Fortin, 2016). Il est à noter que les choix mâle et femelle ne sont pas mutuellement exclusifs, comme par exemple chez la blatte *Blatella germanica* où on observe un évitement de consanguinité de la part des deux sexes (Lihoreau *et al.*, 2008).

II. Sélection pré- et post-copulatoire

Pendant longtemps, l'étude de la sélection sexuelle a été restreinte à l'observation des comportements de compétition et de choix avant l'intromission des organes génitaux mâles dans le corps de la femelle (Darwin, 1871; Eberhard, 1996). Dans ce contexte, un meilleur accès à l'accouplement est souvent observé pour les partenaires les plus hétérozygotes (Ryder *et al.*, 2010; Laloi *et al.*, 2011) ou les plus dissimilaires (Olsson *et al.*, 2003; Hoglund *et al.*, 2017). Cependant, l'idée que la sélection sexuelle peut continuer à s'exercer après l'intromission a fini par émerger dans les années soixante-dix. Les travaux de Parker (1970) ont ainsi mis en évidence l'existence de la compétition spermatique, au cours de laquelle les spermatozoïdes de différents mâles entrent en compétition pour l'accès aux gamètes suite à un accouplement multiple de la part de la femelle (Diesel, 1990; Gage, 1992). Quelques années plus tard, Thornhill (1983) a évoqué pour la première fois la notion de choix femelle cryptique, englobant l'ensemble des mécanismes à disposition des femelles pour biaiser l'utilisation des spermatozoïdes en faveur d'un mâle plutôt qu'un autre (Eberhard, 1996; Firman *et al.*, 2017). Le concept de sélection sexuelle post-copulatoire rassemblant la compétition spermatique et le choix femelle cryptique (même si ces deux processus sont souvent difficiles à distinguer l'un de l'autre (Birkhead, 1998; Eberhard, 2000)) est désormais utilisé pour effectuer la distinction avec la sélection pré-copulatoire, ayant lieu avant la copulation (Birkhead & Pizzari, 2002). La sélection post-copulatoire est notamment responsable dans de nombreux cas du meilleur succès de partenaires hétérozygotes (Frere *et al.*, 2015) ou génétiquement dissimilaires (Lovlie *et al.*, 2013; Firman & Simmons, 2015).

III. Lien avec la diversité génétique chez *A. vulgare* ?

Ce premier chapitre comporte trois parties concernant les divers aspects de la sélection sexuelle en relation avec la diversité génétique chez *A. vulgare*. Une première étude s'intéresse au choix mâle pour les caractéristiques génétiques de sa (ses) partenaire(s). Deux femelles sont proposées à un mâle via l'utilisation d'un dispositif de choix en Y, nous permettant de nous focaliser sur un choix pré-copulatoire. Dans une deuxième partie de ce chapitre, nous positionnons cette fois-ci le sexe femelle

en situation de choix, en plaçant deux mâles et une femelle ensemble sur une durée autorisant la reproduction, puis en réalisant des analyses de paternité sur la descendance obtenue. Ce protocole ne nous autorise pas la distinction entre les évènements pré- et post-copulatoires, mais nous permet d'observer le résultat de leur action combinée directement sur le succès reproducteur de chaque mâle. Pour finir, une étude complémentaire initialement élaborée à des fins de cartographie des descendants dans le *marsupium* selon l'ordre d'accouplement et les caractéristiques génétiques de leurs pères apporte des informations confortant certaines observations préalablement réalisées dans la deuxième étude.

B. Préférence mâle pour les caractéristiques génétiques des femelles

I. Présentation de l'étude

Cette première étude porte sur le choix pré-copulatoire pour les caractéristiques génétiques des partenaires sexuels (Durand *et al.*, 2015). Nous avons ainsi comparé l'attractivité de deux femelles dont les caractéristiques génétiques (hétérozygotie et similarité génétique au mâle) ont été mesurées à l'aide de marqueurs microsatellites. Pour cela, nous avons utilisé un test de choix en Y : chaque femelle a été placée à l'extrémité d'un bras du Y et séparée du reste du dispositif par un grillage à mailles fines. Nous avons ensuite mesuré le temps passé par le mâle focal, initialement placé dans le troisième bras du Y, auprès de chacune des femelles afin de déterminer sa préférence (**Figure 5**). Ce protocole permet au mâle d'effectuer un choix à courte distance, mais n'autorise pas les interactions physiques entre individus.

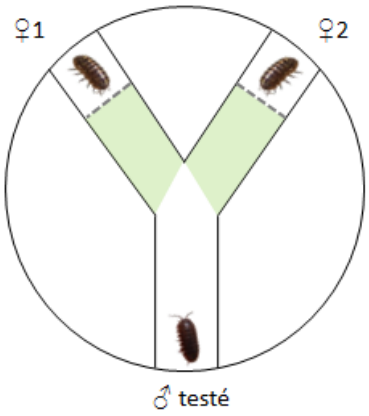

Figure 5 Schéma du dispositif de test en Y utilisé dans cette étude. Le mâle est initialement placé à l'extrémité du bras, et le temps passé par le mâle dans les zones représentées en vert sur ce schéma est mesuré durant 15 minutes.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une absence de préférence systématique pour les femelles les plus hétérozygotes ou les moins similaires. En revanche, la préférence mâle pour la femelle la moins similaire augmente lorsque la différence de similarité au mâle entre les deux femelles est importante (figure 1, page 6 de la publication). Cette observation indique que la préférence serait dépendante de l'étendue des variations en similarité génétique parmi les partenaires disponibles, suggérant qu'un certain écart entre les femelles serait nécessaire pour que le mâle puisse les

discriminer, ou pour que le bénéfice obtenu par le choix soit significatif. Toutefois, un écart important d'hétérozygotie entre les deux femelles annule la préférence mâle pour la dissimilarité, même si l'écart de similarité au mâle entre les femelles est important. L'hétérozygotie a donc probablement une importance dans le choix de partenaire en interférant avec la préférence pour la dissimilarité, mais son rôle précis reste à déterminer.

L'ensemble de ces résultats reste à confirmer avec l'observation de l'accouplement, afin de vérifier si la préférence du mâle observée dans les tests de choix en Y correspond bien à une préférence sexuelle.

II. Publication "How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*?" Ethology, 121(11): 1122-1130 (2015)

ethology international journal of behavioural biology

Ethology

RESEARCH PAPER

How Do Females' Genetic Characteristics Influence Male Mate Preference in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*?

Sylvine Durand, Fanny Beauché, Freddie-Jeanne Richard & Sophie Beltran-Bech

Université de Poitiers, UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Laboratoire EBI Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Poitiers, France

Correspondence
Sophie Beltran-Bech, Université de Poitiers - UFR Sciences Fondamentales et Appliquées. Laboratoire EBI Ecologie & Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267. Equipe Ecologie, Evolution, Symbiose, Bâtiment B8-B35, 6 rue Michel Brunet TSA 51106 F-86073 POITIERS Cedex 9.
E-mail: sophie.beltran.bech@univ-poitiers.fr

Received: June 5, 2015
Initial acceptance: July 19, 2015
Final acceptance: August 26, 2015
(T. Tregenza)

doi: 10.1111/eth.12429

Keywords: *Armadillidium vulgare*, genetic diversity, genetic similarity, heterozygosity, inbreeding avoidance, mate preference

Abstract

Genetic diversity is a key factor that can influence mate choice in many species. We experimentally determined the influence of this factor on mate preference in the crustacean terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. This biological model is gregarious which could increase the risk of inbreeding by mating with closely related partners. Mechanisms of inbreeding avoidance during mate choice can thus be expected. Moreover, previous studies predict that males would be the choosy sex. We performed Y-choice tests giving males the choice between two females presenting different levels of heterozygosity and genetic similarity to the male. Our results show potential inbreeding avoidance according to the genetic characteristics of females presented to males. The higher the variation in genetic similarity to the male between females is, the higher the preference of the male towards the most dissimilar female is. Hence, male preferences may only be detectable when the difference between females' genetic characteristics is large enough. If heterozygosity is associated with fitness in *A. vulgare* (as in many organisms), the patterns of mate preference we observe may be adaptive.

Introduction

Genetic diversity is a key factor for evolution through natural selection with much evidence for correlation between genetic heterozygosity and individual fitness (Chapman et al. 2009). Heterozygosity affects various fitness-linked traits such as survival, immune system performance and reproductive success (Kempenaers 2007). Thus, producing highly heterozygous offspring seems to be a promising investment. Even if the importance of indirect benefits (like good genes transmitted to the offspring or increased genetic diversity in offspring) is still debated (Cothran et al. 2012), mate choice increasing offspring individual genetic diversity has been reported in various species. In this context, genetic heterozygosity of offspring might be optimized by choosing mates on traits reflecting their heterozygosity (Brown 1997; Kempenaers 2007; García-Navas et al. 2009) and/or their genetic dissimilarity with the choosy sex (Mays & Hill 2004; Beltran et al. 2008).

Mate choice to increase offspring genetic heterozygosity is likely to be very beneficial in populations at risk for infection as individual heterozygosity is often linked to immunocompetence. This has been particularly studied using major histocompatibility complex (MHC) molecular markers whose heterozygosity confers a selective advantage against multiple infections in vertebrate species such as some mammals (Penn et al. 2002; Oliver et al. 2009) and fish (Evans & Neff 2009). Moreover, in an outbred songbird population, a high level of microsatellite heterozygosity was found to be related to lower individual risks of infection (MacDougall-Shackleton et al. 2005). This relationship between heterozygosity and susceptibility to infections is also known in some invertebrates (Puurtinen et al. 2004; Whitehorn et al. 2011). For example, low genetic diversity in bumblebee populations is associated with higher parasite loads (Whitehorn et al. 2011).

In the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*, it has been shown that males are able to discriminate

between different females (Moreau et al. 2001; Beauché & Richard 2013). This potential position of the male as the choosy sex can be partly explained by the female-biased sex ratio induced by feminizing *Wolbachia* bacteria which naturally infect wild woodlouse populations (Martin et al. 1973; Bouchon et al. 1998). Moreover, *A. vulgare* is a gregarious species (Takeda 1984) which might increase the risk of mating with closely related individuals because of increased social interactions and attractiveness to conspecifics through aggregation pheromones (Beauché & Richard 2013; Broly et al. 2013). In the species *Blattella germanica* (L.) which exhibits a similar gregarious behaviour, mutual mate choice for inbreeding avoidance has also been described (Lihoreau et al. 2008). In this context, the model *A. vulgare* appears pertinent to study the effect of genetic characteristics (i.e. heterozygosity and/or genetic similarity) on male mate choice. A choice for increasing offspring heterozygosity is expected due to gregariousness and associated risks of inbreeding.

In this manuscript, we propose to test the effect of females' genetic characteristics (heterozygosity and genetic similarity to male) on male mate choice using microsatellite markers, a tool to assess general, neutral and fine genetic characteristics (heterozygosity and genetic similarity between male and females) of individuals in which parentage relationships are unknown.

Material and Methods

Animals

Specimens of *Armadillidium vulgare* were derived from a natural population collected in Denmark (Helsingör) in 1982. Specimens have been maintained in laboratory-controlled conditions since collection (20°C, natural photoperiod of Poitiers, France). Each spring since collection, crosses were performed, offspring have been sexed and males and females separated in different boxes before sexual maturity so as to ensure their virginity. The breeding has been controlled to avoid inbreeding. Individuals are maintained in boxes on moistened compost, and they are fed with slices of fresh carrots and dried leaves of linden (*Tilia sp.*) *ad libitum*.

For our experiments, we selected 112 1-yr-old individuals in different family lines (from this same initial population of Denmark) so as not to have female sisters or brother–sisters combinations in the same behavioural test (cf. 2.2). We are sure that all the 49 males and 63 females used in our behavioural tests are virgin as males and females from the same litter are separated as soon as sexing is possible (but before sexual maturity) to prevent reproduction between them. Thus, all the individuals used in our experiments were 1 yr old, sexually mature and virgin.

Behavioural Tests

For a given male, we tested the attractiveness of two females which present the same physiological status (intermoult) and the same size but which can differ in their genetic characteristics (i.e. heterozygosity and/or genetic similarity to male, estimated *a posteriori*) (n = 57 experimental tests of male preference). To test the attractiveness of potential mate in *A. vulgare*, we used a Y-shaped choice chamber built in a plastic Petri dish (9.5 cm diameter) covered with a new filter paper between each experiment as in Beauché & Richard (2013). The target females were placed in two sections at the top of the right and left tunnels separated from the rest of the device by a mesh. This step was performed 15 min before the beginning of the experiment so that the animals get accustomed to the device. The tested male was then carefully transferred inside the bottom tunnel of the Y-shaped chamber. The time spent (in seconds) by the male in each side (left and right) of the Y-shaped choice chamber was monitored by recording his behaviour using the program EthoLog 2.2 (Ottoni 2000). Each test lasted for 10 min and was performed in the afternoon, in a room with the same conditions of temperature and humidity as the ones where animals are kept in and in near-darkness. Some males and females were used several times in the behavioural tests leaving them a few days of recovery between the tests. The absence of physical contact beside antennal contact between the individuals of the triad also enabled us to test several times the same individual under different conditions, knowing that a given male was never presented twice to the same female to avoid familiarity biases. This allowed us to have additional tests without adding individuals.

Microsatellite Genotyping

All the individuals used for behavioural tests (112 animals in total composed of 63 females and 49 males) were genotyped using 11 microsatellites loci (Table 1) previously described on *A. vulgare* (Verne et al. 2006; Giraud et al. 2013) to determine their genetic characteristics (heterozygosity and genetic similarity).

Table 1: Markers developed by Verne et al. (2006) and Giraud et al. (2013)

Locus (accession n.)	Primer sequences (5′–3′)	Size Range	Multiplex	Dye	He	Ho	Allele Number
Av1 (DQ234304)	F(1): TGGAGTCAACTCACATTCTG R: TGTCTGTAAAACTTGTGCTACG	107-115	1	6-FAM	0.5978	0.5440	5
Av2 (DQ234305)	F(1): TGAAGTTCGGGTGAATTGTG R: ATACCATGACGTGTCGCAAG	158-164	1	6-FAM	0.5071	0.5081	3
Av3 (DQ234306)	F(2): TGAGTCTCATTATAGTTTGGATGA R: TCCTCTCTATACCCCATAATTTCA	192-225	2	6-FAM	0.7007	0.7040	5
Av4 (DQ234307)	F(1): CCGAACCTTTCGAAGGTATT R: AAGGCACATAACATTTTCACAAA	187-244	1	6-FAM	0.5818	0.5000	3
Av5 (DQ234308)	F(1): CGTGCGAAGTTCAGATTCTTT R: GCGCGCTCGAGGATTTAC	261-308	1	6-FAM	0.7816	0.8130	6
Av6 (DQ234309)	F(1): GGAATGAGGTCGTCGACTATG R: GTCTTTCAAACGGGCACAAT	167-175	2	6-FAM	0.5322	0.5484	4
Av9 (DQ234312)	F(1): TCTCGAAGAATTGCCTCACA R: CGATGACTGGGACAATCTCA	196-202	1	HEX	0.1592	0.1694	3
Av18[a] (AV0018)	F: GAAGAAATTCAAACTTCACCATCA R: CTTTGAACAGACTTACGAATAACATC	97-124	3	HEX	0.5800	0.5040	4
Av32[a] (AV0032)	F:TTTCAACCTTCCTAACCAAACC R: TTGTTTTATATCCACGACCATCC	87-113	3	NED	0.7244	0.7520	6
Av56[a] (AV0056)	F: TTCAAAGGAGCGTTTGACCT R: AACCACAGCAACAACAGCAG	203-224	3	6-FAM	0.6749	0.8080	4
Av63[a] (AV0063)	F: CAAAACATCTGTACGGATTCCC R: GCCAAACATAAATGCTCGCT	133-145	3	NED	0.1421	0.1532	2

[a]Markers developed by Giraud et al. (2013). Dye represents the label of the forward primer; 6-FAM: blue fluorescein label; HEX: green fluorescein label, NED: yellow fluorescein label.

Sampling

One leg was sampled from each individual with thin tweezers which enabled the determination of genetic characteristics of individuals without killing the animals.

DNA extraction

Total DNA was extracted from the sampled leg by digestion in 100 mM Tris–HCl, pH 8.0/10 mM EDTA/100 mM NaCl/0.1% SDS/50 mM dithiothreitol/proteinase K (0.5 g/ml) for 4 h at 37°C. DNA was purified by extracting it twice with phenol/chloroform-isoamyl [1/2:1/2 (vol/vol)], and once with chloroform-isoamyl. The sample was then concentrated by adding 1/10 volume of potassium acetate and 1 volume of isopropanol for DNA precipitation at −20°C overnight. After 70% ethanol rinsing, DNA was dissolved in 50 µl of sterile water.

DNA amplification

We amplified 11 microsatellite markers using primers pooled in 3 multiplexes (Table 1) (Verne et al. 2006; Giraud et al. 2013). For each marker, the forward PCR primer was 5′ fluorescein labelled. PCRs were carried out in a total volume of 10 µl using the QIAGEN Multiplex PCR kit with 5 µl of QIAGEN Multiplex PCR master mix, 1 µl of primer mix (2 µM of each primer from multiplex 1, 2 or 3, 10 mM Tris–HCl and 1 mM EDTA), 1 µl of extracted DNA (diluted by 1/20) and RNase-free water. Using a thermocycler (Bio-Rad), amplification was conducted according to the PCR program for amplification of microsatellite loci defined for the current kit: 15 min at 95°C (initial activation step), followed by 30 cycles consisting of 94°C for 30 s, 57°C for 90 s, and 72°C for 60 s. The last extension step was at 60°C for 30 min.

Genotyping

About 0.7 µl of each PCR product was mixed with 0.25 µl of the red-dye-labelled GeneScan size standard ROX 500 (Applied Biosystems) and 9.25 µl of deionized formamide. After denaturation, the mixture was analysed by electrophoresis using an automatic sequencer (Applied Bio System 3130 Avant). The size of the alleles was then determined using the software GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).

Genetic Analyses and Variables

Heterozygosity (H) was calculated for each individual as their number of heterozygous loci divided by their total number of genotyped loci. It theoretically ranges

from 0 (i.e. no heterozygous locus) to 1 (i.e. all heterozygous loci). As we assess heterozygosity from raw microsatellite data, missing data can appear. In this case, heterozygosity is scored only for the non-missing loci. Genetic similarity (r) was estimated between the male and each female proposed to him, using the r coefficient of Wang (Wang 2002). This coefficient considers the probability for two individuals to share an allele, given the estimated allele frequencies in the population. We estimate it using the program SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vekemans 2002). It theoretically ranges from -1 (i.e. the male and the female are very dissimilar) and 1 (i.e. the male and the female are very similar). For each behavioural test, H was calculated for each individual of a triad and r for the two potential pairs. We decided to name 'female 1′ the preferred female, that is the female near which the male spent higher time, whereas 'female 2′ is the non-preferred female, near which the male spent less time. We defined ΔH as the difference in heterozygosity between female 1 and female 2, and Δr as the difference in genetic similarity to the male between the female 1 and female 2. ΔH theoretically ranges between -1 and 1, being negative when the female near which the male spent higher time is the least heterozygous one, and positive when the female near which the male spent higher time is the most heterozygous one. Δr theoretically ranges between -2 and 2 and is negative when the female near which the male spent higher time is the least similar one to the male, and positive when the female near which the male spent higher time is the most similar one to the male.

We also defined |ΔH| as the difference (in absolute value) in overall heterozygosity between the two females proposed to the same male and |Δr| (in absolute value) as the difference in genetic similarity to the male between the two females. |ΔH| theoretically ranges between 0 (no difference in heterozygosity between the two females proposed to the male) and 1 (maximum difference in heterozygosity between the two females proposed to the male). |Δr| theoretically ranges between 0 (no difference in similarity to the male between the two females proposed to male) and 2 (maximum difference in similarity to the male between the two females proposed to male).

We defined Δt as the difference of time spent by the male near each female during the behavioural test. Since we classified the females (female 1 was the female near which the male spent the most time), the values of Δt are always positive. Finally, male preference for female heterozygosity is scored 1 when female 1 is the most heterozygous female and 0 when female 1 is the least heterozygous female. Male preference for female genetic dissimilarity is scored 1 when female 1 is the least genetically similar female and 0 when female 1 is the most genetically similar female.

Statistical Analyses

We first tested the effect of H and r for both females on male preference for female 1 using conditional logistic regression. This type of analyse allowed us to test for the effect of both female's genetic characteristics knowing which one of the two females has been preferred by the male.

We then investigated how the distance between females influenced male preference. We tested for the effect of ΔH and Δr, as well as their absolute value, on Δt with a multiple linear regression. Here Δt was log-transformed for a better fit of the model. We then tested the effect of the distance between females on male choice for heterozygosity and for dissimilarity. As we defined female 1 as the preferred female, ΔH is always positive if this female is also the most heterozygous and always negative if she is the least heterozygous. Thus, choice for heterozygosity and ΔH are correlated, and so are choice for dissimilarity and Δr, for the same reasons. In consequence, we only tested the effect of the absolute values of the differences between females on male preference, using nominal logistic regressions.

To test our hypothesis that male preference for the most dissimilar or most heterozygous female would lead to more heterozygous offspring, we simulated 100 offspring arising from matings between each possible male–female pair. This number of offspring corresponds approximately to the brood size in laboratory lineages for this species. Then, we compared mean offspring heterozygosity with randomized paired t-test. To do so, we used R scripts provided by Harrison et al. (2013a) available on the Dryad data repository (Harrison et al. 2013b).

All statistical analyses and graphical representations were performed in R v3.1.1 (R Development Core Team 2013). In all cases, when we tested two independent variables in the same model, we included first-order interactions and removed them if they were not significant.

As some males were tested several times in our behavioural tests (6 males were used twice or 3 times), all the models we used were mixed-effects models with male as a random effect to account for a possible individual effect on male mate choice. To this purpose, we used the 'lme4′ package (Bates et al.

2014) for multiple and nominal logistic regressions, and the 'coxme' package (Therneau 2015) for the conditional logistic regression. The 'effects' package (Fox 2003) allowed us to predict the probabilities of choice for genetic dissimilarity for graphical representation. We set the level of significance at 0.05 and parameters are given ± standard deviation.

Results

Behavioural Tests

In our behavioural tests, the total time spent by the tested males near each female ranges from 0 to 599 s (mean time spent = 272 ± 230 s). Table S1 in supplementary file details the results for each replicate of our behavioural tests.

Genetic Analyses

Genetic coefficients (i.e. H and r) for and between the individuals used for the behavioural tests and ΔH and Δr are reported in Table S1 (Table S1). Heterozygosity (H) of all individuals used in the behavioural experiments ranged from 0.18 to 0.82 (mean H = 0.55 ± 0.15), and genetic similarity (r) for all male–female pairs ranged from −0.32 to 0.75 (mean $r = 0.03$ ± 0.23). ΔH ranged from −0.46 to 0.46 (mean ΔH = 0.03 ± 0.23) and Δr ranged from −0.84 to 0.92 (mean Δr = −0.04 ± 0.38). |ΔH| ranged from 0.04 to 0.46 (mean |ΔH| = 0.20 ± 0.12) and |Δr| ranged from 0.0002 to 0.92 (mean |Δr| = 0.27 ± 0.25). All of these coefficients presented an important variation within our replicates of behavioural tests which permits to test the effect of these variables on the male preference.

Effect of Females' Genetic Characteristics on Male Mate Preference

Effect of female heterozygosity and similarity to the male on male preference

Male mate preference, evaluated as more time spent by the male near the preferred female, did not depend on female heterozygosity, nor on female genetic similarity to the male within a given pair of females (conditional logistic regression, n = 57, Table 2).

Influence of genetic difference between females on the difference of time spent by the male near each female

The difference between females in terms of heterozygosity and similarity to the male did not explain the difference of time the male spent near each female (multiple linear regression, n = 57, Table 3a), nor did the absolute value of such differences (multiple linear regression, n = 57, Table 3b).

Table 2: Effects of female heterozygosity (H) and genetic similarity to the male (r) on male preference

	Coefficient	SE	df	z	p
H	0.89	1.17	1	0.76	0.45
r	−0.58	0.73	1	−0.8	0.43

Effect of difference between female genetic characteristics on male preference for heterozygosity and for genetic dissimilarity

Male mate preference for the most heterozygous female was not influenced by the absolute difference for genetic characteristics between females (nominal logistic regression, n = 57, Table 4a). Conversely, there was a positive effect of |Δr| on male preference for the most dissimilar female, as well as a strong negative effect of the interaction between |ΔH| and |Δr| (nominal logistic regression, n = 57, Table 4b). In other words, male preference for genetic dissimilarity

Table 3: Effect of genetic differences between females on the difference of time Δt spent by the male near each female using (a) relative values of difference between females (b) absolute values of difference between females

	Estimate	SE	df	t	p
(a)					
Δr	−0.17	0.32	1	−0.52	0.61
ΔH	−0.63	0.52	1	−1.21	0.23
(b)					
|Δr|	0.64	0.48	1	1.34	0.19
|ΔH|	−0.11	0.99	1	−0.11	0.91

Δr: difference in genetic similarity to the male between females; ΔH: difference in heterozygosity between females.

Table 4: Effect of the absolute values of genetic differences between females on male mate choice (a) for the most heterozygous female, (b) for the most dissimilar female

	Estimate	SE	df	z	p
(a)					
|Δr|	1.9	1.18	1	1.60	0.11
|ΔH|	−0.85	2.29	1	−0.37	0.71
(b)					
|Δr|	9.1	4.07	1	2.24	0.03
|ΔH|	6.39	3.96	1	1.62	0.11
|Δr|*|ΔH|	−28.45	13.99	2	−2.03	0.04

Δr: difference in genetic similarity to the male between females; ΔH: difference in heterozygosity between females.

increases with an increasing |Δr|. This is particularly true for low |ΔH| values, but higher values of |ΔH| seem to attenuate the effect of |Δr| (Fig. 1).

Benefits of choosing the most heterozygous or dissimilar female in terms of offspring heterozygosity

The mean simulated offspring heterozygosity was higher for matings with the most heterozygous female than for matings with the least heterozygous one (randomized paired *t*-test, n = 57, $p < 0.001$). Similarly, matings with the most dissimilar female would result in a mean offspring heterozygosity higher than in matings with the least dissimilar female (randomized paired *t*-test, n = 57, $p < 0.001$).

Discussion

By conducting Y-choice tests with genotyped individuals of *A. vulgare*, we did not show a systematic mate choice for the most heterozygous or genetically dissimilar female, even though such choice would benefit males in leading to more heterozygous offspring. Nevertheless, we observed that male preference for the most dissimilar female is conditioned by the presence of a large difference in similarity to male between females. In this context, when females are genetically different enough in terms of similarity to male, the male should do the choice for the most dissimilar female. Similarly, in natural populations of blue tits (*Cyanystes caeruleus*), the proportion of offspring sired by extra-pair males is higher when the difference in relatedness to the female between social and extra-pair mates is high and when extra-pair mates are less related to the female than social mate (Foerster et al. 2006). This kind of result could be explained either by the need of detectable variations in genetic characteristics of potential mates for the male to be able to discriminate which female is the best choice, or by the need of a difference large enough for the choice to be beneficial. Indeed, the choice for dissimilarity would not be worthy if there was a small difference between females' similarity to the male. Nevertheless, this choice is less pronounced in case of large female difference in heterozygosity. It is possible that such difference in heterozygosity disturbs the mechanisms of male mate choice by altering his perception of the difference in female dissimilarity.

Genetic dissimilarity in our model seems to have a higher impact on male preference, males being more attracted by the most genetically dissimilar female. *A. vulgare* is gregarious (Takeda 1984) which could increase risks of mating with close relatives and thus inbreeding depression. As a consequence, choosing more dissimilar mate could be a way of avoiding inbreeding depression and optimizing the heterozygosity of the offspring. In our study, we used animals that are maintained in laboratory conditions to avoid inbreeding depression with controlled breeding. This method could eventually eliminate the evolutionary strategy of inbreeding avoidance in our population. Our results showed that it is apparently not the case. It could be the result of a strong pressure from inbreeding in our model. Mutual mate choice for inbreeding avoidance has been observed in *Blatella germanica* (Lihoreau et al. 2008). In this gregarious cockroach, pairs formed through mate choice for non-sibling partner have a higher reproductive success

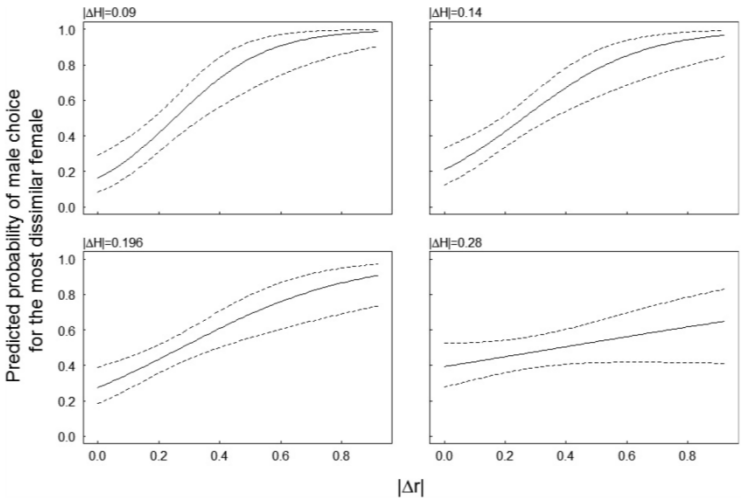

Fig. 1: Predicted probability of choice for the most dissimilar female depending on the difference between female similarity to male and between female heterozygosity. The probability of choice is predicted by nominal logistic regression (see Table 4b) and is presented for varying values of absolute difference in female similarity to the male |Δr|, and for four fixed values of absolute difference in female heterozygosity |ΔH|. Those four values correspond to the quantiles at 20, 40, 60 and 80% of our observed values.

than inbred pairs. Studying the relationships between heterozygosity and fitness parameters (like survival, reproductive success or fertility of individuals) in *A. vulgare* has never been performed and would provide insights into the persistence of inbreeding avoidance strategy even in populations in which inbreeding is unlikely (like in case of laboratory-controlled conditions). Moreover, some experiments using animals trapped in the field would be interesting in order to compare natural populations to laboratory ones, strong effects in natural population being potentially expected.

According to our results on *A. vulgare*, males should be able to choose for inbreeding avoidance but the impact of this potential choice for inbreeding avoidance in terms of offspring genetic heterozygosity has to be tested experimentally. As said previously, in the gregarious cockroach *Blatella germanica*, mutual mate choice has been observed (Lihoreau et al. 2008). In this context, female choice for males and in particular for their genetic characteristics needs to be experimentally tested on *A. vulgare*.

A male attraction for female genetic dissimilarity depending on the difference between available partners is detected in this work, with genetic dissimilarity estimated using neutral microsatellite polymorphism. Empirical literature predicts a fitness benefit from genetic diversity and a tendency to use genetic dissimilarity for mate choice using estimators of genetic dissimilarity based on neutral microsatellite polymorphism (Beltran & Boissier 2009; Lie et al. 2010) but also functional polymorphic genes like MHC (major histocompatibility complex) in vertebrates like mice (Ehman & Scott 2001; Penn et al. 2002; Ilmonen et al. 2009) or humans (Chaix et al. 2008; Lie et al. 2010). The MHC is a gene complex only present in vertebrates, but lots of genes (implied notably in immunity) in invertebrates are polymorphic (Ghosh et al. 2011) like the *FREPs* in snails (Zhang et al. 2004), the *Dscam* in arthropods (Brites et al. 2011). Testing the effect of diversity on these functional genes on individuals fitness related traits (immunity, survival, etc.) would be of great interest. Investigating genetic dissimilarity between individuals on these polymorphic genes and testing their effect on mate preference but also on resulting offspring quality (number, survival and immunity competence) and more generally in sexual selection could be really interesting in invertebrates and in particular in *A. vulgare*. Finally, analysing the covariance between diversity for these genes and for the neutral microsatellites markers used in this study would permit a better understanding of the dynamics of selective pressures on the genome of our biological model.

A mate choice for genetic dissimilarity could increase offspring genetic heterozygosity and would be very beneficial in *A. vulgare* populations, particularly in populations naturally infected by the endosymbiote *Wolbachia*. Indeed, in infected populations, genetic heterozygosity might partly determine the fitness of host (Beltran-Bech & Richard 2014) and adaptive mate choice could be an important factor in the evolutionary arms race between the host (here *A. vulgare*) and its parasite (here *Wolbachia*). Taking into account the effect of combination of infection and neutral and/or functional genetic dissimilarity between the sexual partners can help us to understand the proximate and ultimate factors implied in mate choice.

Acknowledgements

We would like to thank Coraline Rivière, Daniel Guyonnet, Alexandra Laffite and Ludovic Pascal for their technical assistance, Aurélie Cohas for her valuable help on statistics, Valérie Bech for the final English improving of the manuscript and Didier Bouchon, Isabelle Litrico, Winka Le Clec'h, Nicolas Bech, Christine Braquart-Varnier and the anonymous reviewers for their constructive comments. This work was supported by the french Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the CNRS.

Literature Cited

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2014: lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-7. http://CRAN.R-project.org/package=lme4.

Beauché, F. & Richard, F.-J. 2013: The best timing of mate search in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea). PLoS ONE **8**, e57737.

Beltran, S. & Boissier, J. 2009: Are schistosomes socially and genetically monogamous? Parasitol. Res. **104**, 481—483.

Beltran, S., Cezilly, F. & Boissier, J. 2008: Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. PLoS ONE **3**, e3328.

Beltran-Bech, S. & Richard, F.-J. 2014: Impact of infection on mate choice. Anim. Behav. **90**, 159—170.

Bouchon, D., Rigaud, T. & Juchault, P. 1998: Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci. **265**, 1081—1090.

Brites, D., Encinas-Viso, F., Ebert, D., Du Pasquier, L. & Haag, C. R. 2011: Population genetics of duplicated alternatively spliced exons of the *Dscam* gene in *Daphnia* and *Drosophila*. PLoS ONE **6**, e27947.

Broly, P., Deneubourg, J. L. & Devigne, C. 2013: Benefits of aggregation in woodlice: a factor in the terrestrialization process? Insectes Soc. **60**, 419—435.

Brown, J. L. 1997: A theory of mate choice based on heterozygosity. Behav. Ecol. **8**, 60—65.

Chaix, R., Cao, C. & Donnelly, P. 2008: Is mate choice in humans MHC-dependent? PLoS Genet. **4**, e1000184.

Chapman, J. R., Nakagawa, S., Coltman, D. W., Slate, J. & Sheldon, B. C. 2009: A quantitative review of heterozygosity–fitness correlations in animal populations. Mol. Ecol. **18**, 2746—2765.

Cothran, R. D., Chapman, K., Stiff, A. R. & Relyea, R. A. 2012: "Cryptic" direct benefits of mate choice: choosy females experience reduced predation risk while in precopula. Behav. Ecol. Sociobiol. **66**, 905—913.

Ehman, K. D. & Scott, M. E. 2001: Urinary odour preferences of MHC congenic female mice, Mus domesticus: implications for kin recognition and detection of parasitized males. Anim. Behav. **62**, 781—789.

Evans, M. L. & Neff, B. D. 2009: Major histocompatibility complex heterozygote advantage and widespread bacterial infections in populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Mol. Ecol. **18**, 4716—4729.

Foerster, K., Valcu, M., Johnsen, A. & Kempenaers, B. 2006: A spatial genetic structure and effects of relatedness on mate choice in a wild bird population. Mol. Ecol. **15**, 4555—4567.

Fox, J. 2003: Effect displays in R for generalised linear models. J. Stat. Softw. **8**, 1—27.

García-Navas, V., Ortego, J. & Sanz, J. J. 2009: Heterozygosity-based assortative mating in blue tits (*Cyanistes caeruleus*): implications for the evolution of mate choice. Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci. **276**, 2931—2940.

Ghosh, J., Lun, C. M., Majeske, A. J., Sacchi, S., Schrankel, C. S. & Smith, L. C. 2011: Invertebrate immune diversity. Dev. Comp. Immunol. **35**, 959—974.

Giraud, I., Valette, V., Bech, N., Grandjean, F. & Cordaux, R. 2013: Isolation and characterization of microsatellite loci for the Isopod Crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in Terrestrial Isopods. PLoS ONE **8**, e76639.

Hardy, O. J. & Vekemans, X. 2002: SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol. Ecol. Notes **2**, 618—620.

Harrison, X. A., York, J. E., Cram, D. L. & Young, A. J. 2013a: Extra-group mating increases inbreeding risk in a cooperatively breeding bird. Mol. Ecol. **22**, 5700—5715.

Harrison, X. A., York, J. E., Cram, D. L. & Young, A. J. 2013b: Data from: extra-group mating increases inbreeding risk in a cooperatively breeding bird. Dryad Digit. Repos. **22**, 5700—5715. doi:10.5061/dryad.v8q6c.

Ilmonen, P., Stundner, G., Thoss, M. & Penn, D. J. 2009: Females prefer the scent of outbred males: good-genes-as-heterozygosity? BMC Evol. Biol. **9**, 104.

Kempenaers, B. 2007: Mate choice and genetic quality: a review of the heterozygosity theory. Adv. Study Behav. **37**, 189—278.

Lie, H. C., Simrnons, L. W. & Rhodes, G. 2010: Genetic dissimilarity, genetic diversity, and mate preferences in humans. Evol Hum Behav **31**, 48—58.

Lihoreau, M., Zimmer, C. & Rivault, C. 2008: Mutual mate choice: when it pays both sexes to avoid inbreeding. PLoS ONE **3**, e3365.

MacDougall-Shackleton, E. A., Derryberry, E. P., Foufopoulos, J., Dobson, A. P. & Hahn, T. P. 2005: Parasite-mediated heterozygote advantage in an outbred songbird population. Biol. Lett. **1**, 105—107.

Martin, G., Juchault, P. & Legrand, J. J. 1973: Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoide *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. C. R. Acad. Sci. IIb. Mec. **276**, 2313—2316.

Mays, H. L. Jr & Hill, G. E. 2004: Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. Trends Ecol. Evol. **19**, 554—559.

Moreau, J., Bertin, A., Caubet, Y. & Rigaud, T. 2001: Sexual selection in an isopod with *Wolbachia*-induced sex reversal: males prefer real females. J. Evol. Biol. **14**, 388—394.

Oliver, M. K., Telfer, S. & Piertney, S. B. 2009: Major histocompatibility complex (MHC) heterozygote superiority to natural multi-parasite infections in the water vole (*Arvicola terrestris*). Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci. **276**, 1119—1128.

Ottoni, E. B. 2000: EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. Behav. Res. Methods **32**, 446—449.

Penn, D. J., Damjanovich, K. & Potts, W. K. 2002: MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. Proc. Natl Acad. Sci. **99**, 11260—11264.

Puurtinen, M., Hytönen, M., Knott, K. E., Taskinen, J., Nissinen, K. & Kaitala, V. 2004: The effects of mating system and genetic variability on susceptibility to trematode parasites in a freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. Evolution **58**, 2747—2753.

R Development Core Team. 2013: R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/.

Takeda, N. 1984. The aggregation phenomenon in terrestrial isopods. In: Symposia of the zoological soci-

ety of London. Cambridge University Press, Cambridge, ROYAUME-UNI, pp. 381—404.
Therneau, T. M. 2015: coxme: Mixed Effects Cox Models. R package version 2.2-4. http://CRAN.R-project.org/package=coxme.
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*. Mol. Ecol. Notes **6**, 328—330.
Wang, J. 2002: An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. Genetics **160**, 1203—1215.
Whitehorn, P. R., Tinsley, M. C., Brown, M. J. F., Darvill, B. & Goulson, D. 2011: Genetic diversity, parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci. **278**, 1195—1202.
Zhang, S.-M., Adema, C. M., Kepler, T. B. & Loker, E. S. 2004: Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. Science **305**, 251—254.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1. Table containing all the results of our behavioural tests.

Table S1 Table containing all the results of our behavioural tests. Each line represents a replicate, n=57. H: heterozygosity coefficient, r: similarity coefficient. Time measures are given in seconds. If the male spent more time near the most heterozygous female, choice for heterozygosity is coded 1, 0 otherwise. If the male spent more time near the most dissimilar female, choice for dissimilarity is coded 1, 0 otherwise.

Experiment Replicates	Male	Hmale	Female 1 (F1)	Female 2 (F2)	HF1	HF2	ΔH (HF1-HF2)	|ΔH|	r1	r2	Δr (r1-r2)	|Δr|	Time near F1 (TF1)	Time near F2 (TF2)	Δt (TF1-TF2)	Choice for Heterozygosity	Choice for Dissimilarity
1	CM07	0,27	CF13	CF14	0,36	0,45	-0,09	0,09	0,15	0,13	0,02	0,02	283,15	228,47	54,68	0	0
2	CM18	0,18	CF35	CF36	0,55	0,27	0,28	0,28	-0,24	-0,22	-0,02	0,02	273,43	247,76	25,67	1	1
3	CM17	0,55	CF34	CF33	0,73	0,45	0,28	0,28	-0,22	-0,25	0,03	0,03	368,35	144,06	224,29	1	0
4	CM32	0,45	CF15	CF16	0,5	0,6	-0,1	0,1	-0,12	-0,15	0,03	0,03	469,73	97,13	372,6	0	0
5	CM01	0,64	CF2	CF01	0,5	0,55	-0,05	0,05	-0,14	-0,18	0,04	0,04	282,06	205,09	76,97	0	0
6	CM20	0,27	CF39	CF38	0,64	0,5	0,14	0,14	-0,36	-0,32	-0,04	0,04	598,11	0	598,11	1	1
7	CM04	0,64	CF8	CF07	0,4	0,45	-0,05	0,05	0,03	0,08	-0,05	0,05	309,5	222,87	86,63	0	1
8	CM31	0,45	CF28	CF31	0,55	0,64	-0,09	0,09	-0,1	-0,16	0,06	0,06	339,89	222,76	117,13	0	0
9	CM33	0,45	CF37	CF34	0,27	0,73	-0,46	0,46	0,05	-0,02	0,07	0,07	598,66	0	598,66	0	0
10	CM13	0,64	CF25	CF26	0,64	0,6	0,04	0,04	-0,1	-0,02	-0,08	0,08	525,51	6,77	518,74	1	1
11	CM22	0,64	CF41	CF06	0,7	0,36	0,34	0,34	0,02	0,12	-0,1	0,1	567,01	18,61	548,4	1	1
12	CM16	0,36	CF32	CF31	0,55	0,64	-0,09	0,09	0,06	0,16	-0,1	0,1	346,58	133,43	213,15	0	1
13	CM05	0,4	CF8	CF07	0,55	0,73	-0,18	0,18	0,24	0,1	0,14	0,14	488,43	105,8	382,63	0	0
14	CM29	0,36	CF28	CF31	0,64	0,45	0,19	0,19	0,08	-0,07	0,15	0,15	595	0	595	1	0
15	CM08	0,36	CF37	CF34	0,5	0,6	-0,1	0,1	0,22	0,06	0,16	0,16	210,1	143,98	66,12	0	0
16	CM10	0,4	CF20	CF19	0,5	0,36	0,14	0,14	0,06	-0,11	0,17	0,17	569,72	0	569,72	1	0
17	CM34	0,36	CF35	CF26	0,55	0,6	-0,05	0,05	0,29	0,1	0,19	0,19	598,21	0	598,21	0	0
18	CM36	0,45	CF40	CF38	0,55	0,5	0,05	0,05	-0,02	-0,22	0,2	0,2	595,67	0	595,67	1	0
19	CM02	0,36	CF03	CF04	0,45	0,27	0,18	0,18	0,12	0,32	-0,2	0,2	553,32	2,74	550,58	1	1
20	CM35	0,55	CF32	CF04	0,55	0,27	0,28	0,28	0,09	-0,15	0,24	0,24	319,9	276,7	43,2	1	0
21	CM03	0,45	CF05	CF6	0,45	0,36	0,09	0,09	-0,02	0,33	-0,35	0,35	333,55	245,2	88,35	1	1
22	CM21	0,55	CF40	CF13	0,55	0,36	0,19	0,19	0,11	-0,27	0,38	0,38	264,61	121,99	142,62	1	0
23	CM14	0,36	CF27	CF28	0,45	0,55	-0,1	0,1	-0,3	0,12	-0,42	0,42	541,41	50,16	491,25	0	1
24	CM15	0,45	CF30	CF29	0,73	0,27	0,46	0,46	-0,18	0,27	-0,45	0,45	559,07	0	559,07	1	1
25	CM28	0,45	CF08	CF21	0,4	0,36	0,04	0,04	-0,2	0,38	-0,58	0,58	579,62	0	579,62	1	1
26	CM26	0,27	CF12	CF18	0,55	0,45	0,1	0,1	-0,13	0,54	-0,67	0,67	577,9	0	577,9	1	1
27	CM11	0,64	CF21	CF22	0,36	0,73	-0,37	0,37	0,37	-0,38	0,75	0,75	420,06	93,53	326,53	0	0
28	CM09	0,6	CF17	CF18	0,64	0,45	0,19	0,19	-0,15	0,69	-0,84	0,84	286,54	192,49	94,05	1	1
29	FM10	0,64	FF05	FF03	0,55	0,73	-0,18	0,18	0,02	0,04	-0,01	0,01	559,12	0	559,12	0	1
30	FM08	0,64	FF08	FF30	0,45	0,82	-0,37	0,37	-0,07	-0,04	-0,02	0,02	349,27	231,86	117,41	0	1
31	FM07	0,5	FF56	FF24	0,36	0,73	-0,37	0,37	0,07	0,02	0,06	0,06	597,77	0	597,77	0	0
32	FM35	0,82	FF02	FF56	0,64	0,36	0,28	0,28	0,01	-0,05	0,07	0,07	276,17	101,96	174,21	1	0
33	FM08	0,64	FF07	FF21	0,82	0,73	0,09	0,09	0,15	0,05	0,11	0,11	517,67	0	517,67	1	0
34	FM22	0,55	FF26	FF45	0,73	0,45	0,28	0,28	-0,09	-0,20	0,11	0,11	593,67	0	593,67	1	0
35	FM10	0,64	FF30	FF08	0,82	0,45	0,37	0,37	0,08	-0,04	0,12	0,12	580,38	0	580,38	1	0
36	FM08	0,64	FF49	FF28	0,44	0,64	-0,2	0,2	0,07	-0,09	0,15	0,15	595,94	0	595,94	0	0
37	FM36	0,55	FF61	FF30	0,82	0,45	0,37	0,37	0,01	0,19	-0,18	0,18	258,99	230,87	28,12	1	1
38	FM04	0,73	FF08	FF05	0,45	0,55	-0,1	0,1	-0,07	-0,27	0,20	0,20	456,96	0	456,96	0	0
39	FM03	0,4	FF25	FF28	0,73	0,64	0,09	0,09	0,09	-0,11	0,20	0,20	575,9	0	575,9	1	0
40	FM07	0,5	FF25	FF09	0,73	0,55	0,18	0,18	0,08	-0,15	0,23	0,23	597,33	0	597,33	1	0

Table S1 (continued)

Experiment Replicates	Male	Hmale	Female 1 (F1)	Female 2 (F2)	HF1	HF2	ΔH (HF1-HF2)	|ΔH|	r1	r2	Δr (r1-r2)	|Δr|	Time near F1 (TF1)	Time near F2 (TF2)	Δt (TF1-TF2)	Choice for Heterozygosity	Choice for Dissimilarity
41	FM46	0,55	FF70	FF58	0,6	0,82	-0,22	0,22	0,27	0,01	0,27	0,27	584,01	0	584,01	0	0
42	FM45	0,55	FF08	FF72	0,45	0,73	-0,28	0,28	-0,09	0,20	-0,30	0,30	592,73	0	592,73	0	1
43	FM03	0,4	FF41	FF45	0,64	0,45	0,19	0,19	0,23	-0,07	0,30	0,30	379,6	183,94	195,66	1	0
44	FM21	0,7	FF06	FF03	0,45	0,73	-0,28	0,28	-0,17	0,16	-0,33	0,33	585,79	0	585,79	0	1
45	FM44	0,64	FF24	FF68	0,73	0,64	0,09	0,09	0,01	0,38	-0,37	0,37	585,09	0	585,09	1	1
46	FM26	0,64	FF09	FF06	0,55	0,45	0,1	0,1	-0,12	0,29	-0,40	0,40	584,87	0	584,87	1	1
47	FM10	0,64	FF45	FF23	0,45	0,73	-0,28	0,28	-0,12	0,32	-0,44	0,44	592,94	0	592,94	0	1
48	FM42	0,73	FF55	FF73	0,73	0,64	0,09	0,09	-0,12	0,42	-0,54	0,54	596,57	0	596,57	1	1
49	FM28	0,73	FF24	FF08	0,73	0,45	0,28	0,28	0,41	-0,16	0,57	0,57	371,46	0	371,46	1	0
50	FM43	0,73	FF58	FF68	0,82	0,64	0,18	0,18	-0,25	0,34	-0,59	0,59	591,3	0	591,3	1	1
51	FM29	0,64	FF73	FF21	0,64	0,73	-0,09	0,09	-0,26	0,38	-0,65	0,65	567,69	0	567,69	0	1
52	FM33	0,64	FF30	FF61	0,82	0,45	0,37	0,37	-0,07	0,64	-0,71	0,71	390,1	73,49	316,61	1	1
53	FM32	0,55	FF56	FF72	0,36	0,73	-0,37	0,37	0,69	-0,04	0,73	0,73	402,41	183,92	218,49	0	0
54	FM39	0,73	FF73	FF61	0,64	0,45	0,19	0,19	-0,47	0,36	-0,83	0,83	298,65	108,07	190,58	1	1
55	FM04	0,73	FF22	FF45	0,73	0,45	0,28	0,28	0,75	-0,17	0,92	0,92	593,94	0	593,94	1	0
56	FM27	0,55	FF56	FF30	0,36	0,82	-0,46	0,46	0,05	0,05	0,00	0,00	528,73	46,92	481,81	0	1
57	FM22	0,55	FF29	FF23	0,82	0,73	0,09	0,09	-0,18	-0,18	0,00	0,00	246,3	154,09	92,21	1	0

C. Comment des caractéristiques génétiques des mâles conditionnent-elles leur succès de paternité ?

I. Présentation de l'étude

La dissection du mécanisme de sélection sexuelle en ses différentes composantes (compétition intra- *vs.* intersexuelle, ainsi que sélection pré- *vs*. post-copulatoire) est nécessaire dans le sens où elle nous permet d'obtenir un aperçu fin des mécanismes en jeu. Cependant, ces différentes composantes n'interviennent pas indépendamment dans la nature et peuvent avoir des effets différents sur le succès reproducteur de chaque sexe, en particulier étant donné l'existence de conflits sexuel entre les deux sexes (Parker, 2006). En raison de cela, les études expérimentales qui contrôlent certains aspects de la sélection sexuelle afin de se focaliser sur l'un d'entre eux peuvent conduire à une représentation incomplète du mécanisme de sélection sexuelle. Les observations réalisées en laboratoire sur un processus donné ne suffisent pas forcément à expliquer les patrons de reproduction présents dans les systèmes naturels (Wagner, 1998; Zandberg *et al.*, 2017). En conséquence, des protocoles permettant le déroulement de l'intégralité de la séquence de sélection sexuelle sont indispensables pour mesurer l'effet de la sélection sur le succès reproducteur des individus.

Dans ce contexte, nous avons cherché à étudier l'effet des caractéristiques génétiques de mâles (hétérozygotie et similarité génétique à la femelle) sur leur succès de paternité, plaçant ainsi les femelles en situation de sexe de choix (Durand *et al.*, 2017). Pour cela, nous avons mis en contact deux mâles et une femelle que nous avons laissés ensemble jusqu'à ce que la femelle soit gravide, permettant ainsi à toutes les composantes de sélection sexuelle d'avoir lieu. Nous avons ensuite prélevé 30 descendants par portée afin d'effectuer des tests de paternité et estimer le succès reproducteur des deux mâles en compétition (**Figure** 6).

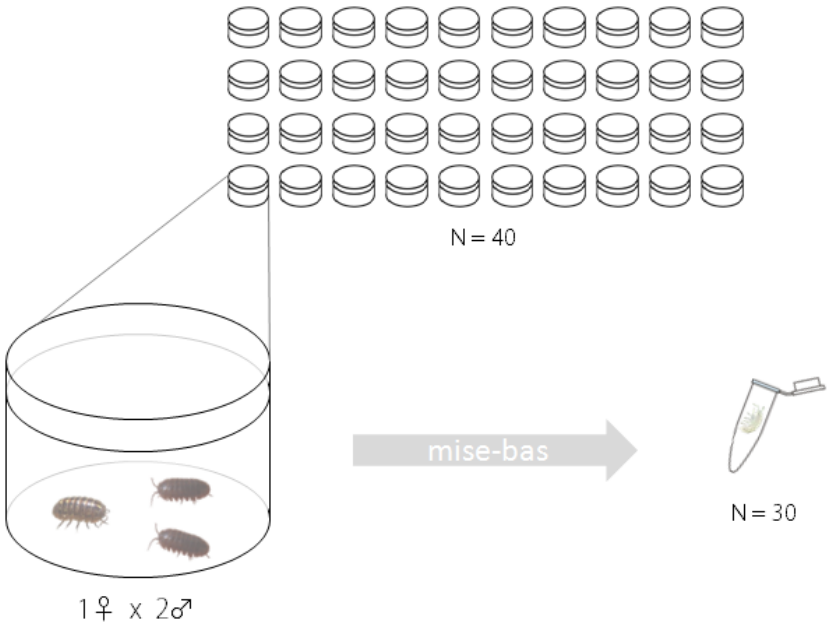

Figure 6 Protocole expérimental utilisé au cours de cette étude. Nous avons initialement réalisé 40 réplicas, ce qui nous a permis d'analyser 28 portées au final. Pour chaque portée, 30 *pulli* ont été collectés individuellement pour des analyses de paternité.

Le nombre de pères, de deux dans la moitié des portées obtenues, n'est prédit par aucune caractéristique génétique étudiée. En revanche, les mâles plus hétérozygotes ont un meilleur succès de paternité, et ce quel que soit le nombre de pères impliqués dans la portée (figure 1, page 6 de la publication). L'hétérozygotie confère alors probablement un avantage aux mâles, que ce soit en termes de compétition intra-sexuelle et/ou de choix femelle, mécanismes indissociables dans notre expérience. Par ailleurs, un meilleur succès des mâles les plus dissimilaires est observé uniquement lorsqu'un seul mâle engendre des descendants. La similarité génétique étant une caractéristique relative au partenaire, la compétition mâle-mâle ne peut être évoquée pour expliquer ce résultat. Un choix pour un partenaire dissimilaire pourrait alors exister dans notre modèle, et le fait que les portées issues de parents plus dissimilaires comportent plus de descendants suggère une valeur adaptative pour un tel choix (figure 2, page 6 de la publication).

II. Publication "Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*" Behavioral Ecology and Sociobiology, 71: 90 (2017)

Behav Ecol Sociobiol (2017) 71:90
DOI 10.1007/s00265-017-2317-1

ORIGINAL ARTICLE

Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*

Sylvine Durand[1] · **Aurélie Cohas**[2] · **Christine Braquart-Varnier**[1] · **Sophie Beltran-Bech**[1]

Received: 24 November 2016 / Revised: 6 April 2017 / Accepted: 26 April 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract
Mate choice for compatible partners has been gaining interest during the past years, which implies that what represents a suitable male varies between females and that genetic diversity in offspring should be increased. In this context, mechanisms of mate choice for heterozygous and/or genetically dissimilar partners can be expected. To test for the presence of such mechanisms in the gregarious crustacean *Armadillidium vulgare*, we performed experimental crosses allowing a female to reproduce with two males. More heterozygous males had a higher paternity success whatever the number of males (only one or both males) participating in reproduction, which could result from better competing abilities or from female preference for such males. When only one male fathered a brood, this male was the most genetically dissimilar to the female, suggesting the existence of a female choice for dissimilarity. Additionally, the more genetically similar both males were to the female, the fewer offspring were produced per brood. Genetic diversity is thus likely to be involved in both pre- and post-copulatory processes, as well as to have an impact on fitness in this terrestrial isopod. This work improves our understanding of the genetic characteristics involved in mating behaviours, and provides insights on the mechanisms at the basis of genetic diversity maintenance.

Significance statement
Amongst the many parameters that can be taken into account during mate choice, genetic characteristics must not be neglected, as more and more studies highlight that what is best for one female may not be best for another. Here, we show that both heterozygosity and genetic similarity can influence paternity success in a gregarious terrestrial isopod. This could have strong implications in terms of fitness as a high genetic similarity has a negative impact on offspring number in this species. This work reflects the growing interest for genetic variables, and is positioned at the interface between molecular biology and behavioural ecology.

Keywords Genetic diversity · Heterozygosity · Mate preference · Inbreeding avoidance · Multiple mating · Compatibility

Communicated by N. Wedell

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00265-017-2317-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sylvine Durand
durand.sylvine@gmail.com

[1] Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Ecologie, Evolution, Symbiose, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, F-86073 Poitiers, France

[2] Université de Lyon F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622 Villeurbanne, France

Published online: 13 May 2017

Introduction

For a long time, the idea of a single best male for all females was widespread. Indeed, during male-male competition, it is expected that some phenotypic traits such as body weight (Wedell 1997) or weapon size (Karino et al. 2005) are determinant for male reproductive success, and that males possessing higher values for these traits are more likely to outcompete rivals. Regarding female choice, the Fisherian runaway theory (Fisher 1930) and the good-gene hypothesis (Fisher 1915; Garcia-Gonzalez and Simmons 2011) predict

that female preference for given male traits should evolve whenever exaggerated ornaments (under the Fisherian runaway theory) or traits advertising higher fitness (under the good-gene hypothesis) can be transmitted to offspring. These male-male competition and female choice theories imply sexual selection acting on a specific set of alleles and consequently predict a reduction of genetic diversity in populations. However, studies on genetic compatibility between partners (Zeh and Zeh 1996; Tregenza and Wedell 2000) have more recently undermined this "single best male for all females" paradigm. Several examples of mate choice for compatible partners have been empirically highlighting different best males depending on the female and an increased genetic diversity of offspring (Foerster et al. 2003; Beltran et al. 2008; Kamiya et al. 2014).

The effects of genetic diversity on fitness at the individual level have been investigated through numerous studies on heterosis (increased trait values for hybrid offspring resulting from a cross between inbred lines) (Zhang et al. 2008) or inbreeding depression (Keller and Waller 2002; Coltman and Slate 2003; Charlesworth and Willis 2009). In a wide range of organisms from plants to invertebrates and vertebrates, individuals presenting low levels of heterozygosity often experience lower survival (Rossiter et al. 2001) and/or lower reproductive success (Slate et al. 2000).

In this context, we can expect heterozygosity to be a sexually selected trait (Brown 1997; Hoffman et al. 2007; Kempenaers 2007). Indeed, if some phenotypic traits determining male-male competition are correlated with individual genetic diversity, more heterozygous males are expected to outcompete other males in both pre- and post-copulatory processes. In the black grouse, heterozygous males are more likely to gain territories compared to their competitors, which increases their lifetime reproductive success (Hoglund et al. 2002), and in the clam shrimp, inbred (consequently less heterozygous) males produce half the amount of sperm than outbred males, which is likely to lead to a strong disadvantage in sperm competition (Weeks et al. 2009).

Heterozygosity could also be the target of female mating preferences. As stated in the "good-gene-as-heterozygosity" theory (Brown 1997), females can benefit from having more heterozygous offspring, which should have a better fitness due to positive heterozygosity-fitness correlations (Zeh and Zeh 1996; Kempenaers 2007; Kamiya et al. 2014). Three different strategies can lead to a genetically diverse progeny. First, a female can prefer to mate with heterozygous males. Theoretical studies predict a positive correlation between parental and offspring heterozygosity when allelic frequencies are uneven, a situation likely to occur in natural populations (Mitton et al. 1993; Fromhage et al. 2009; Nietlisbach and Hadfield 2015), and such correlation has been reported in several empirical studies (Mitton et al. 1993; Garcia-Navas et al. 2009). Hence, mate choice for heterozygous partners to produce heterozygous offspring can be expected (Lehmann et al. 2007), and has been highlighted in natural populations, such as in the wire-tailed manakin *Pipra filicauda*, where females select more heterozygous males as mating partners (Ryder et al. 2010). According to the disassortative mating hypothesis, also called genetic compatibility (Tregenza and Wedell 2000), a second possibility is a choice for genetically dissimilar partners, as in the Australian sleepy lizard *Tiliqua rugosa* (Bull and Cooper 1999) or in the parasite *Schistosoma mansoni* (Beltran et al. 2008). Mating with an individual that possesses other alleles for a given locus ensures that offspring will inherit different alleles from its parents, leading to an increase in offspring heterozygosity. Finally, a third strategy to improve genetic diversity in offspring is through multiple matings (Yasui 1998; Jennions and Petrie 2000). In addition to ensure that more paternal alleles are present in the progeny as a whole (genetic diversity hypothesis) (Yasui 1998; Jennions and Petrie 2000), polyandry may also evolve to ensure that most offspring will be sired by genetically dissimilar males, provided that post-copulatory mechanisms can favour the use of sperm from the more dissimilar males, or favour female investment in embryos sired by the more dissimilar males (Tregenza and Wedell 2000; Simmons 2005).

The woodlouse *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Oniscidea) is a gregarious terrestrial isopod (Takeda 1984). Mating strategies to avoid inbred matings and their deleterious effects on individual's fitness might have evolved in this species, as a preference for dissimilar mates has already been highlighted in *A. vulgare* males when the available females present a large range of genetic similarity (Durand et al. 2015). A classic prediction in sexual selection theory is that the choosy sex should be the one investing the most in the offspring, whether in terms of gamete production or parental care (Bateman 1948; Trivers 1972; Kokko and Jennions 2008). Female isopods further invest heavily in reproduction and suffer costs from carrying offspring in their marsupial pouch for 1 month (Kight and Ozga 2001). Though to this day, no female choice has ever been described in this species, *A. vulgare* females nevertheless can be expected to perform both pre- and post-copulatory mate choice. They store the sperm of the different males they mated with in their spermatheca before egg fertilisation (Moreau and Rigaud 2002; Ziegler and Suzuki 2011). This structure could allow both sperm competition and cryptic female choice to take place, two nonexclusive post-copulatory mechanisms from which the outcome could be potentially impacted by genetic characteristics (Tregenza and Wedell 2002; Gage et al. 2006; Frasier et al. 2013). Moreover, multiple mating occurs in the wild in *A. vulgare* (Valette et al. 2017), and females are able to mate with a second male within a few hours after a first mating, even though only 25% of females remate if they are later presented to a new male (Moreau et al. 2002). To this day, the factors conditioning the acceptance of a second mating are

unknown, and we ignore whether females might mate with several males which can be assessed simultaneously. Multiple paternity patterns (i.e. offspring repartition between multiple fathers) are not determined by sperm precedence (Moreau et al. 2002) but might be influenced by the genetic characteristics of partners (Olsson et al. 1996; Bretman et al. 2004; Fitzpatrick and Evans 2014). All these elements make *A. vulgare* a relevant model to study the importance of heterozygosity in sexual selection.

In this paper, we searched for mechanisms that favour genetic diversity amongst offspring for *A. vulgare* females. To investigate this question, we performed experimental crosses involving one female and two males. To allow both pre- and post-copulatory processes to occur, we consider the resulting progeny. Microsatellite markers were used to perform paternity tests and to investigate whether sexual selection could promote genetic diversity. We here search for evidence of (1) multiple mating performed by females when several males are available at the same time, (2) a female preference for the most genetically dissimilar male and (3) an advantage for the most heterozygous mate in sexual selection (via either female mate choice or male-male competition). As these hypotheses are independent, we can make three nonexclusive predictions: (1) both males should participate in reproduction, (2) the male which is the most dissimilar to the female within a pair of males should father more offspring than the other male and/or (3) the most heterozygous male of a pair should father more offspring than the other male.

Material and methods

Biological model

The common pillbug *A. vulgare* (Latreille, 1804) is a terrestrial isopod belonging to the suborder Oniscidea. This arthropod is a widespread detritivore that lives in groups in a variety of open environments such as grasslands, but also in anthropised sites like gardens. Reproduction takes place between April and October (Vandel 1962), and woodlouse reproductive cycle is tightly linked with moulting cycle. Matings occur during the week preceding female parturial moult (Moreau et al. 2002), characterised by the apparition of a marsupial pouch on the ventral side of the female. The parturial moult is followed by fertilisation as eggs cross the spermatheca whilst entering the oviduct. Eggs are afterwise laid in the marsupial pouch, and incubated for 1 month until fully developed juveniles leave the marsupium (Surbida and Wright 2001).

Experimental procedure

Experimental population

The animals used in our experiments originate from a wild population collected in Helsingör (Denmark) in 1982, and since reared in laboratory under the natural photoperiod of Poitiers, France (46° 35′ N, 0° 20′ E) at 20 °C on moistened soil and fed with dried lime tree leaves (*Tilia* sp.) and fresh carrot slices. The absence of symbiotic bacteria of the genus *Wolbachia*, which commonly infect *A. vulgare* and have an impact on woodlouse reproduction and sexual behaviour (Bouchon et al. 1998; Moreau et al. 2001), has been controlled regularly. Crosses are performed each year between animals of known pedigree to minimise inbreeding. Once born, siblings are kept together in boxes, then sexed as soon as possible (approximately 3 months) to separate males and females before sexual maturity, so as to obtain groups of virgin brothers and virgin sisters.

Experimental setup

We performed our experiments on 40 females and 80 males, all of them being 1-year-old virgin individuals that never encountered individuals of the other sex. Each female was placed together with two males in a small cylindrical plastic box on moistened soil with lime tree leaves and carrot slices under a 18:6-h light:dark photoperiod to stimulate reproduction. Males were randomly assigned to females, but all the individuals were of approximately the same size and belonged to different sibships. As males in moulting period are not sexually receptive, we weekly checked the moulting status of individuals, and removed both males of the box if one of them appeared to begin moult. Males were placed back with the female after the moult, so that each female was always presented to two sexually receptive males at the same time. Once a female laid eggs in her marsupial pouch (usually between 2 and 6 weeks after being placed with the males), she was separated from males to ensure a good development of offspring. After approximately 1 month of gravidity, females released completely formed juveniles that were all counted and collected within 3 days after birth. Thirty randomly chosen juveniles of each clutch were collected separately for genetic analyses. As data in our study result from molecular analysis and not from behavioural observations, there is no possibility for observer bias necessitating blinded methods.

This protocol allows to determine a posteriori which male fathered each offspring, but the behavioural, physiological and cellular processes conditioning the paternity cannot be determined as they occur prior to birth. Indeed, this experiment was not designed to disentangle pre- and post-copulatory mechanisms.

Genetic analyses

Adult genotyping

Right before crosses were performed, a leg was collected from each adult using thin tweezers. We performed phenol-chloroform DNA extraction on those samples, consisting in digestion of sample with proteinase K, purification with phenol and chloroform isoamyl washing and then precipitation with sodium acetate and isopropanol (Durand et al. 2015). DNA was afterwards diluted by 1/20th. We then performed genotyping on DNA extracts using 11 microsatellite markers gathered in three multiplexes (Appendix 1) (Verne et al. 2006; Giraud et al. 2013). PCR reactions, product separation in a sequencer and determination of product size were conducted as indicated in Appendix 1.

Paternity analyses on juveniles

Due to the high number of offspring to genotype (30 per brood, for a total of 840 offspring from 28 broods), we selected a Chelex DNA extraction which presents the advantage to be faster than phenol-chloroform extraction. Animals were placed without crushing in 120 μL of sterile water, 10 μL of proteinase K (20 mg/mL) and 20 μL of a 5% Chelex solution (Sigma-Aldrich). Samples were placed at 56 °C for 3 h, then at 95 °C for 10 min.

Knowing the genotype of adults, we selected for each triad a locus (or a set of loci if necessary), allowing us to determine the paternity of offspring by detecting which allele was inherited from the father without ambiguity.

For each of the 30 extracted DNA of collected juveniles of a brood, PCRs were performed on the selected locus in the same PCR mix using amplification conditions as in adults (Appendix 1), but in simplex condition (i.e. only one primer pair was used at a time). Then, PCR products were gathered in poolplex for separation in the sequencer; in the same way as in a multiplex, we avoided any size overlap between markers, so that we could assemble products from different individuals in the same solution. Genotyping was then performed as in adults. Once the genotype of each juvenile was obtained, we compared it to the genotypes of the adults in the triad to determine which allele was inherited from the father and then assign a father to each offspring. Once paternity was assessed, we qualified the type of brood as "unique paternity" when only one father was detected, and as "multiple paternity" when two fathers were detected, and we named "major male" the male who fathered the majority of offspring in a given brood (i.e. either more offspring than the other male of the dyad or all offspring in the brood) and "minor male" the other one.

Genetic variables

For each adult, mean heterozygosity (H) was estimated by dividing the total number of heterozygous loci by the number of genotyped loci. H ranges from 0 for individuals with no heterozygous locus to 1 for individuals with all heterozygous loci. We also calculated the r coefficient of Wang (2002) between each male and the female to which he was proposed using SPAGeDi 1.2 (Hardy and Vekemans 2002). This coefficient estimates genetic similarity between individuals, more precisely the probability that two individuals share a given allele, taking into account allelic frequencies in the population. It can range from −1 for completely genetically dissimilar individuals to 1 for completely genetically similar individuals.

We calculated the difference in heterozygosity between the major and the minor male (ΔH). ΔH was thus positive if the major male was more heterozygous than the minor male, and negative otherwise. Similarly, the difference in genetic similarity to the female between the major and the minor male (Δr) was calculated. Δr was positive if the major male was more similar to the female than the minor male. Those two last coefficients were calculated because we can expect that a substantial difference between males is needed for a choice to occur.

All those genetic variables were standardised prior to including them into statistical models by subtracting the mean of the variable to each value and dividing it by the standard deviation of the variable, in order to get variables centred on zero with a standard deviation of 1. This allows to compare the effect size of different variables whenever they are included simultaneously in a statistical model.

Statistical analyses

1. Does the number of males participating in reproduction depend on their genetic characteristics?

To determine whether a female's brood was fathered by a single or by two males depending on the males' genetic characteristics, generalised linear models (GLMs) were constructed with a logit link and a variance given by a binomial distribution and with the type of brood (0 for "unique paternity" brood and 1 for "multiple paternity" brood) as the dependent variable. Female heterozygosity, major and minor male heterozygosities and genetic similarity for each male-female pair were included as explanatory variables in a first model, as were the differences between males in terms of heterozygosity and genetic similarity to the female in a second model.

2. Is the male with the highest reproductive success the most dissimilar and/or the most heterozygous?

We used a conditional regression with matched pairs constituted of the major male and the minor male. Such regression allowed us to model the probability for a male to father a given offspring within a brood as a function of its heterozygosity and genetic similarity to the female knowing the same genetic characteristics of the other male (i.e. equivalent to work on the difference between males). To take into account the fact that 30 offsprings were considered for a given trio (one female and two males), the identity of the trio was entered as a cluster into the model and the within-cluster correlation was used to estimate the variance parameter (Kleinbaum and Klein 2005).

3. Do male characteristics affect brood size?

To determine whether male genetic characteristics or the type of brood could affect brood size, GLMs were constructed with a log link and a variance given by a negative binomial distribution to account for the overdispersion of brood sizes. The size of the brood was set as the dependent variable; the type of brood was set as explanatory variable in a first model. Then, female heterozygosity, major and minor male heterozygosities and genetic similarity for each male-female pair were included as explanatory variables in a second model. To investigate more in depth the impact of genetic similarity on brood size, two additional models were built. In the first, mean genetic similarity for male-female pairs within a triad was included as explanatory variable; in the second, a new explanatory variable was used, designated as "father(s) genetic similarity", namely either the mean genetic similarity if two males produce offspring, or similarity of the single father if only one male produces offspring. Those two models were built because we ignore if a male that did not father offspring (in case of unique paternity) can influence brood size or not, so we constructed a model to consider each of those possibilities. AICc values were then calculated for each model to determine which one was the most parsimonious.

Statistical analyses were performed with R 3.0.1 (R Development Core Team 2013), the function "glm. nb" in the package "MASS" was used to fit GLMs with a negative binomial distribution (Venables and Ripley 2002), the function "glm" in the package "stats" was used to perform GLMs with other distributions (R Development Core Team 2013), the function "coxme" in the package coxme was used to construct Cox's proportional hazard models with clusters (Therneau 2015), and the function "AICc" in the package "AICcmodavg" was used to calculate AICc values (Mazerolles 2016). We verified that genetic variables were not correlated so that they could be included as explanatory variables in the same statistical models without generating collinearity issues (see Appendix 2 for correlations). Only simple additive effects were included in our models, as no interaction between variables corresponds to tested hypotheses. We built full models including all potential explanatory variables, then in a second step removed the non-significant terms all at once to obtain the minimal model containing only significant variables. In the "Results" section, the estimates obtained from the full models regarding the nonsignificant terms and the estimates from the minimal models regarding the significant terms are provided. Estimates from both the significant and nonsignificant terms obtained from the full models are presented in Appendix 3. We tested for linear effects of the variables using type III ANOVA, therefore testing for a significant effect once the effects of all other variables present in the model being taken into account. For all models, we performed goodness-of-fit tests according to Agresti (2002), in which the sum of squared Pearson residuals of fitted models follows a chi-squared distribution with degrees of freedom equal to the degrees of freedom of the model residual deviance and all models adequately fitted the data. We set the level of significance to $\alpha = 0.05$, and parameter estimates are given as mean ± 1 SE on the logit and log-scales. For all models, we provided odd ratios (exponentiated betas) to ease interpretation of the effect size.

Results

We performed 40 crosses with one female and two males. Only 28 broods were analysed because three females died; one was never gravid; four aborted; and in four cases, we could not manage to assign paternity (either due to issues when genotyping or mismatch between paternal and offspring alleles). Detailed genetic characteristics and brood characteristics for each cross can be found in Appendix 4. Brood size ranged from 61 to 186 offsprings (first quartile $Q_1 = 100$, median $\tilde{x} = 114$, third quartile $Q_3 = 130.5$). The genotype of 20 offsprings could not be determined, leading to a total of 820 offsprings for which we were able to assess paternity, gathered in broods of 26 to 30 analysed offsprings ($Q_1 = 29$, $\tilde{x} = 29.5$, $Q_3 = 30$). The major male of each brood fathered 57 to 100% of the offspring ($Q_1 = 72.4$, $\tilde{x} = 100$, $Q_3 = 100$).

1) Does the number of males participating in reproduction depend on their genetic characteristics?

Amongst the 28 broods, 15 had a unique paternity whilst 13 had a multiple paternity. The type of brood did depend neither on female ($\beta \pm SE = -0.32 \pm 0.48$, exp. ($\beta$) = 0.72, $N = 28$, $p = 0.50$) or male heterozygosity (major male heterozygosity $\beta = -0.13 \pm 0.45$, exp. (β) = 0.88, $N = 28$, $p = 0.77$; minor male heterozygosity $\beta = 0.13 \pm 0.41$, exp. (β) = 1.14, $N = 28$, $p = 0.74$), nor on male-female genetic similarity (similarity with major male $\beta = 0.49 \pm 0.56$, exp. (β) = 1.63, $N = 28$, $p = 0.39$; similarity with minor male $\beta = 0.40 \pm 0.40$, exp. (β) = 1.49, $N = 28$, $p = 0.32$). There was no influence of

the difference between males in terms of heterozygosity ($\beta = 0.13 \pm 0.39$, exp. (β) = 1.14, $N = 28$, $p = 0.75$) or of genetic similarity to the female ($\beta = 0.16 \pm 0.38$, exp. (β) = 1.18, $N = 28$, $p = 0.67$) on the type of brood.

2) Is the male with the highest reproductive success the most dissimilar and/or the most heterozygous?

For all 820 offsprings in the 28 broods, an increase in difference between males' heterozygosity leads to a greater probability for the most heterozygous male to father a given offspring ($\beta = 0.32 \pm 0.05$, exp. (β) = 1.38, $N = 820$, $p < 0.001$; Fig. 1), whilst male-female genetic similarity had not effect ($\beta = -0.10 \pm 0.06$, exp. (β) = 0.91, $N = 820$, $p = 0.09$). In trials where only one male sired the brood, the chance for a male to be the father increased for the most heterozygous male with an increase in heterozygosity difference ($\beta = 0.58 \pm 0.08$, exp. (β) = 1.78, $N = 442$, $p < 0.001$), but decreased for the most similar male with an increase in male-female similarity difference ($\beta = -0.41 \pm 0.10$, exp. (β) = 0.66, $N = 442$, $p < 0.001$). For broods with multiple paternity, paternity success only increased with difference in heterozygosity between males ($\beta = 0.23 \pm 0.09$, exp. (β) = 1.26, $N = 378$, $p = 0.008$) whilst no effect of genetic similarity was observed (male-female similarity $\beta = -0.03 \pm 0.08$, exp. (β) = 0.97, $N = 378$, $p = 0.68$).

3) Do male characteristics affect brood size?

Total brood size was not influenced by the type of brood (unique or multiple, $\beta = 0.09 \pm 0.11$, exp. (β) = 1.09, $N = 28$, $p = 0.39$). Female ($\beta = 0.04 \pm 0.0.5$, exp. (β) = 1.04, $N = 28$, $p = 0.41$) and male heterozygosities (major male $\beta = 0.02 \pm 0.05$, exp. (β) = 1.02, $N = 28$, $p = 0.70$; minor male $\beta = -0.02 \pm 0.05$, exp. (β) = 0.98, $N = 28$, $p = 0.65$) did not impact total brood size, but male genetic similarity did; there was a negative effect of both major male ($\beta = -0.12 \pm 0.06$, exp. (β) = 0.89, $N = 28$, $p = 0.049$) and minor male genetic similarity to the female on brood size ($\beta = -0.08 \pm 0.04$, exp. (β) = 0.92, $N = 28$, $p = 0.042$).

More specifically, when the mean genetic similarity between the female and the two males of a triad increased of one unit (whether the minor male fathered offspring or not), the brood size decreased by 0.86-fold ($\beta = -0.15 \pm 0.05$, exp. (β) = 0.86, $N = 28$, $p = 0.001$, AICc = 274.2; Fig. 2). Similarly, brood size decreased when father(s) genetic similarity with the female increased ($\beta = -0.14 \pm 0.05$, exp. (β) = 0.87, $N = 28$, $p = 0.01$, AICc = 277.3), even if this last model is less parsimonious than the previous one including the two males of the triad.

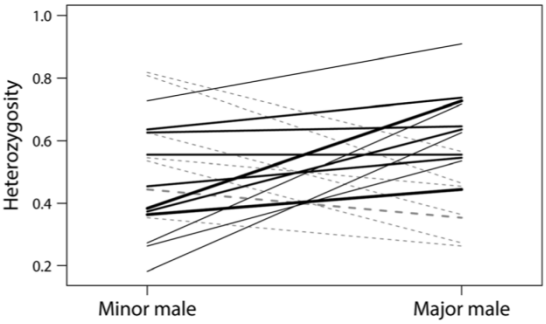

Fig. 1 Heterozygosity of male dyads presented to the same female according to their paternity success. *Solid black line* the major male was the most heterozygous ($N = 20$); *dashed grey line* the major male was the least heterozygous ($N = 8$). The width of the line is proportional to the number of male pairs (from one to three dyads in the same configuration)

Discussion

In the context of mate choice for genetic compatibility, mechanisms that favour mating with heterozygous and/or genetically dissimilar partners are expected. In this manuscript, we highlight the presence of such mechanisms in *A. vulgare*, where half of the females produced broods with more than one father. When only one male fathered the brood, this male was more likely to be the most heterozygous and the most genetically dissimilar to the female of the two males present. In broods with multiple fathers, only a higher heterozygosity predicted a higher paternity success. Since brood size depended on male-female genetic similarity, mate choice for genetic diversity is likely to have strong fitness consequences on individuals.

Half of the broods were fathered by both males, independently of male genetic characteristics, which implies that those

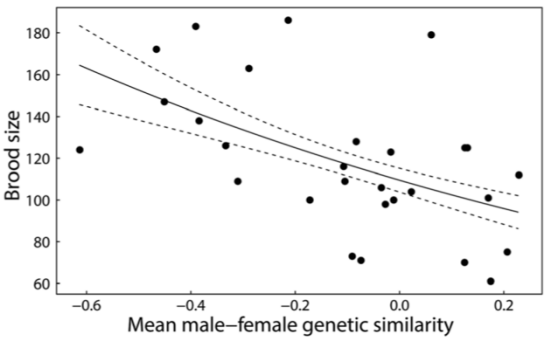

Fig. 2 Effect of the mean male-female genetic similarity of a triad on brood size

females mated twice. Remating under laboratory conditions has already been observed in *A. vulgare*. Moreau et al. (2002) showed that 25% of females remate within hours after a first copulation and explained this low percentage by the presence of a refractory period in females. In our case, several days could have elapsed between the first and the second copulations. This delay could be sufficient for the refractory period to end and could explain the 50% of multiple paternity observed. These results thereby suggest that multiple paternity could be widespread in the wild as the result of remating and using stored sperm from previous copulations (Howard 1943). Indeed, after sampling gravid *A. vulgare* females in the wild and determining the number of males contributing to their broods, multiple paternity was effectively observed in 100% of the broods (Valette et al. 2017), making multiple mating a likely female mating strategy and not an artefact of our experiment being performed under laboratory conditions.

If genetic characteristics did not predict the number of males contributing to the broods, they predicted paternity success. Indeed, a higher heterozygosity led to a higher paternity success whether one or both males fathered offspring. Additionally, when one male monopolised paternity, this male was also the most genetically dissimilar to the female. The male genetic characteristics involved differing between unique and multiple paternity suggest that the mechanisms underlying paternity success differ between the two types of broods. However, we ignore whether unique paternity results from mating with only one male or from mating with both males followed by extreme selection for the sperm of a single male. Such drastic sperm selection has been highlighted in the feral fowl, in which the female can reject the sperm of a subdominant male right after mating (Pizzari and Birkhead 2000), but no similar mechanism has ever been suggested in *A. vulgare*, though sperm ejection by females has already been documented in *Drosophila melanogaster* (Manier et al. 2010). For this reason, it is difficult to disentangle between mechanisms taking place before and after copulation, namely pre- and post-copulatory mechanisms. This study was not designed for this purpose, as we wanted to focus on paternity patterns in the progeny as a result of all mechanisms occurring freely as they would under natural conditions. Other protocols are necessary to distinguish pre- and post-copulatory mechanisms, including for example behavioural observations to investigate pre-copulatory mechanisms and genotyping of spermatozoa in the spermatheca after mating to investigate post-copulatory mechanisms.

Whatever the number of males participating in reproduction, their relative paternity success is predicted by their genetic diversity, with more heterozygous males in trials obtaining more offspring. This could be due to a positive link between male heterozygosity and competing abilities. More diverse males could perform better than the others before mating (Hoglund et al. 2002) or after mating during spermatic competition, especially in the context of inbreeding (Gage et al. 2006; Weeks et al. 2009). Even though in *A. vulgare* male contests have been suggested to be unusual (Lefebvre et al. 2000), we cannot dismiss the hypothesis that paternity success depends on better pre-copulatory capacities related to male genetic characteristics. Moreover, *A. vulgare* spermatozoa are not motile and are grouped in bundles (Cotelli et al. 1976), but nothing is currently known about males' spermatic performances. On the other hand, we cannot exclude the possibility that females exerted a choice for more heterozygous males, either before or after copulation (Ryder et al. 2010; Laloi et al. 2011).

When only one male was involved in offspring production, this male was on average the one presenting the lowest genetic similarity with the female. Male-male competition cannot be responsible for this pattern as genetic similarity is always relative to the female. Hence, other processes such as female choice may be involved. Females could bias paternity success towards the more dissimilar male by pre-copulatory means, either by controlling sperm transfer through asymmetric copulation duration with each partner (Sillén-Tullberg 1985) or by deciding to mate only with the most dissimilar. Male monopolisation of paternity could also result from post-copulatory assessment of genetic similarity with their partner(s). As such, cryptic female choice could favour the more dissimilar sperm, like in the red junglefowl *Gallus gallus* (Lovlie et al. 2013). Alternatively, females could assess male similarity only once a first mating has been performed, and decide to remate with the second male only if the first was not dissimilar enough. Hence, the less similar to the female the first male is, the less likely the female mates again and the more likely the second male is to be more similar to the female than the first male. This could explain why the type of brood is not predicted by male similarity to the female since the effect of similarity on the type of brood could be obscured by the order of mating. Interestingly, a pre-copulatory male preference for genetic dissimilarity has already been shown in *A. vulgare* (Durand et al. 2015). Together with the current study, those results suggest that mutual mate choice for genetically dissimilar partners in *A. vulgare* is likely to occur under natural conditions. Besides, mutual mate choice has been demonstrated in *Blatella germanica*, another arthropod species with a similar gregarious behaviour (Lihoreau et al. 2008). Conversely, a last hypothesis to consider is a differential offspring production for both males independently of female choice, resulting from genetic incompatibility between gametes (Palumbi 1999) or mortality during embryo development (Jin et al. 1995) for the more similar male.

In line with this last hypothesis, genetic similarity does influence brood size; the more genetically similar both males were to the female, the smaller the brood size, similarly to what is observed in other arthropod species (Lihoreau et al. 2008; Müller and Müller 2016). Further work is needed to

determine if the small brood size produced by similar parents results from a low total number of eggs laid by the female or from a decrease in oocyte fertilisation or embryo survival. The decrease in offspring number is likely to impose a selective pressure towards a choice for dissimilar partner, and could explain a female choice for dissimilarity. If so, one can be surprised by the fact that we do not observe a ubiquitous choice for dissimilarity, whereas there is always a strong effect of heterozygosity. It seems legitimate to postulate that when only one male fathered the entire brood, the most dissimilar male was chosen by the female. The co-occurring effect of heterozygosity in this case could be explained either by a simultaneous female choice for male dissimilarity and heterozygosity, as in the fur seal *Arctocephalus gazella* (Hoffman et al. 2007), or by pre-mating male-male competition based on heterozygosity. However, we cannot reach such definitive conclusions about why only heterozygosity (and not dissimilarity) predicts paternity success when both males father offspring. Indeed, we are limited by our knowledge of the role played by both pre- and post-copulatory processes in our experimental design, and cannot distinguish between female choice and male-male competition. Any conclusion would thus be very speculative. In order to go further on this question, additional experiments are required, such as Y-choice tests to investigate female pre-copulatory preferences, or forced copulation assays to determine which factor determines paternity success when controlling for the order of mating for example.

Our study suggests that female choice is likely to be involved in male paternity success. This implies the existence of phenotypic differences between individuals reflecting their genetic characteristics, as in the lekking wire-tailed manakin *Pipra filicauda*, where female preference for heterozygous mates could be based on male wing and tarsus length (Ryder et al. 2010). In our model, sexual interactions have been suggested to be based on chemical cues (Beauche and Richard 2013), as often in arthropods (Howard and Blomquist 2005). Olfactive cues could thereby reflect male genetic characteristics and be implied in a potential female choice for heterozygosity and/or genetic dissimilarity.

Overall, the impact of genetic characteristics on paternity success in *A. vulgare* seems to involve complex processes, which are likely to be even more complex in the wild where females may encounter many more males. This could lead to complicated patterns of multiple paternity, favouring both offspring number and offspring genetic quality through male competition and female choice selecting the “best” male(s) from a broad range of competitors. It is thus likely that operational sex ratio (Kvarnemo and Ahnesjo 1996; Moreau and Rigaud 2000) might strongly constrain the capacity of females to exert a mate choice.

We further highlighted mechanisms that are expected to increase heterozygosity in offspring. This process prevents fixation of alleles (Neff and Pitcher 2005) and is thus likely to contribute to the persistence of genetic diversity in populations. As intraspecific genetic diversity is required for evolutionary processes to take place, understanding sexual selection in relation to genetic characteristics might provide insights on the adaptive potential of populations and the capacity of species to face environmental changes.

Acknowledgements We thank Daniel Guyonnet for the technical assistance in genotyping the animals. Doctoral researches of S. Durand were funded by the Région Nouvelle-Aquitaine, previously Région Poitou-Charentes. The funding is partly granted by the following 2015–2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER). A. Cohas is supported by the Agence Nationale de la Recherche (Project ANR-13-JSV7-0005). This work was supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

Agresti A (2002) Categorical data analysis. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey

Bateman AJ (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. Heredity 2:349–368

Beauche F, Richard FJ (2013) The best timing of mate mearch in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea). PLoS One 8:e57737

Beltran S, Cezilly F, Boissier J (2008) Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in Schistosomes. PLoS One 3:e3328

Bouchon D, Rigaud T, Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc R Soc B-Biol Sci 265:1081–1090

Bretman A, Wedell N, Tregenza T (2004) Molecular evidence of post-copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. Proc R Soc B-Biol Sci 271:159–164

Brown JL (1997) A theory of mate choice based on heterozygosity. Behav Ecol 8:60–65

Bull CM, Cooper SJB (1999) Relatedness and avoidance of inbreeding in the lizard, *Tiliqua rugosa*. Behav Ecol Sociobiol 46:367–372

Charlesworth D, Willis JH (2009) Fundamental concepts in genetics: the genetics of inbreeding depression. Nat Rev Genet 10:783–796

Coltman DW, Slate J (2003) Microsatellite measures of inbreeding: a meta-analysis. Evolution 57:971–983

Cotelli F, Ferraguti M, Lanzavecchia G, Loralamiadonin C (1976) Spermatozoon of Peracarida. 1. Spermatozoon of terrestrial isopods. J Ultrastruct Res 55:378–390

Durand S, Beauché F, Richard F-J, Beltran-Bech S (2015) How do females’ genetic characteristics influence male mate preference in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*? Ethology 121:1122–1130

Fisher RA (1915) The evolution of sexual preference. The Eugenics Review 7:184

Fisher RA (1930) The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford

Fitzpatrick JL, Evans JP (2014) Postcopulatory inbreeding avoidance in guppies. J Evol Biol 27:2585–2594

Foerster K, Delhey K, Johnsen A, Lifjeld JT, Kempenaers B (2003) Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. Nature 425:714–717

Frasier TR, Gillett RM, Hamilton PK, Brown MW, Kraus SD, White BN (2013) Postcopulatory selection for dissimilar gametes maintains

heterozygosity in the endangered North Atlantic right whale. Ecol Evol 3:3483–3494
Fromhage L, Kokko H, Reid JM (2009) Evolution of mate choice for genome-wide heterozygosity. Evolution 63:684–694
Gage MJG, Surridge AK, Tomkins JL, Green E, Wiskin L, Bell DJ, Hewitt GM (2006) Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. Curr Biol 16:612–617
Garcia-Gonzalez F, Simmons LW (2011) Good genes and sexual selection in dung beetles (*Onthophagus taurus*): genetic variance in egg-to-adult and adult viability. PLoS One 6:e16233
Garcia-Navas V, Ortego J, Sanz JJ (2009) Heterozygosity-based assortative mating in blue tits (*Cyanistes caeruleus*): implications for the evolution of mate choice. Proc R Soc B-Biol Sci 276:2931–2940
Giraud I, Valette V, Bech N, Grandjean F, Cordaux R (2013) Isolation and characterization of microsatellite loci for the isopod crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in terrestrial isopods. PLoS One 8:e76639
Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol Ecol Notes 2:618–620
Hoffman JI, Forcada J, Trathan PN, Amos W (2007) Female fur seals show active choice for males that are heterozygous and unrelated. Nature 445:912–914
Hoglund J, Piertney SB, Alatalo RV, Lindell J, Lundberg A, Rintamaki PT (2002) Inbreeding depression and male fitness in black grouse. Proc R Soc B-Biol Sci 269:711–715
Howard HW (1943) Length of life of sperms in the woodlouse *Armadillidium vulgare* Latr. Nature 152:331–331
Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. Annual Review of Entomology, California, pp 371–393
Jennions MD, Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. Biol Rev 75:21–64
Jin K, Ho HN, Speed TP, Gill TJ (1995) Reproductive failure and the major histocompatibility complex. Am J Hum Genet 56:1456–1467
Kamiya T, O'Dwyer K, Westerdahl H, Senior A, Nakagawa S (2014) A quantitative review of MHC-based mating preference: the role of diversity and dissimilarity. Mol Ecol 23:5151–5163
Karino K, Niiyama H, Chiba M (2005) Horn length is the determining factor in the outcomes of escalated fights among male Japanese horned beetles, *Allomyrina dichotoma* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). J Insect Behav 18:805–815
Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. Trends Ecol Evol 17:230–241
Kempenaers B (2007) Mate choice and genetic quality: a review of the heterozygosity theory. In: Brockmann HJ, Roper TJ, Naguib M, Wynne Edwards KE, Barnard C, Mitani J (eds) Advances in the study of behavior, vol 37. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp 189–278
Kight SL, Ozga M (2001) Costs of reproduction in the terrestrial isopod *Porcellio laevis* Latreille (Isopoda: Oniscidea): brood-bearing and locomotion. J Kans Entomol Soc 74:166–171
Kleinbaum DG, Klein M (2005) Survival analysis. Springer-Verlag, New York
Kokko H, Jennions MD (2008) Parental investment, sexual selection and sex ratios. J Evol Biol 21:919–948
Kvarnemo C, Ahnesjo I (1996) The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. Trends Ecol Evol 11:404–408
Laloi D, Eizaguirre C, Federici P, Massot M (2011) Female choice for heterozygous mates changes along successive matings in a lizard. Behav Process 88:149–154
Lefebvre F, Limousin M, Caubet Y (2000) Sexual dimorphism in the antennae of terrestrial isopods: a result of male contests or scramble competition? Can J Zool 78:1987–1993
Lehmann L, Keller LF, Kokko H (2007) Mate choice evolution, dominance effects, and the maintenance of genetic variation. J Theor Biol 244:282–295
Lihoreau M, Zimmer C, Rivault C (2008) Mutual mate choice: when it pays both sexes to avoid inbreeding. PLoS One 3:e3365
Lovlie H, Gillingham MAF, Worley K, Pizzari T, Richardson DS (2013) Cryptic female choice favours sperm from major histocompatibility complex-dissimilar males. Proc R Soc B-Biol Sci 280
Manier MK, Belote JM, Berben KS, Novikov D, Stuart WT, Pitnick S (2010) Resolving mechanisms of competitive fertilization success in *Drosophila melanogaster*. Science 328:354–357
Mazerolles MJ (2016) AICcmodavg: model selection and multimodel inference based on (Q) AIC (c). R package version 20–4 https://cran.r-project.org/package=AICcmodavg
Mitton JB, Schuster WSF, Cothran EG, Defries JC (1993) Correlation between the individual heterozygosity of parents and their offspring. Heredity 71:59–63
Moreau J, Bertin A, Caubet Y, 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 (2000) Operational sex ratio in terrestrial isopods: interaction between potential rate of reproduction and *Wolbachia*-induced sex ratio distortion. Oikos 91:477–484
Moreau J, Rigaud T (2002) The shape of calcium carbonate deposits as an external marker for female reproductive status in terrestrial isopods. J Crustac Biol 22:353–356
Moreau J, Seguin S, Caubet Y, Rigaud T (2002) Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial crustacean. Anim Behav 64:569–577
Müller T, Müller C (2016) Consequences of mating with siblings and nonsiblings on the reproductive success in a leaf beetle. Ecol Evol 6:3185–3197
Neff BD, Pitcher TE (2005) Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. Mol Ecol 14:19–38
Nietlisbach P, Hadfield JD (2015) Heritability of heterozygosity offers a new way of understanding why dominant gene action contributes to additive genetic variance. Evolution 69:1948–1952
Olsson M, Shine R, Madsen T, Gullberg A, Tegelstrom H (1996) Sperm selection by females. Nature 383:585–585
Palumbi SR (1999) All males are not created equal: fertility differences depend on gamete recognition polymorphisms in sea urchins. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12632–12637
Pizzari T, Birkhead TR (2000) Female feral fowl eject sperm of subdominant males. Nature 405:787–789
Development Core Team R (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna http://www.R-projectorg/
Rossiter SJ, Jones G, Ransome RD, Barratt EM (2001) Outbreeding increases offspring survival in wild greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). Proc R Soc B-Biol Sci 268:1055–1061
Ryder TB, Tori WP, Blake JG, Loiselle BA, Parker PG (2010) Mate choice for genetic quality: a test of the heterozygosity and compatibility hypotheses in a lek-breeding bird. Behav Ecol 21:203–210
Sillén-Tullberg B (1985) Relationship between rocking behaviour and copulation termination in *Lygaeus equestris*. Physiol Entomol 10:235–240
Simmons LW (2005) The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. In: Annual review of ecology evolution and systematics. Annual Reviews, Palo Alto, pp 125–146
Slate J, Kruuk LEB, Marshall TC, Pemberton JM, Clutton-Brock TH (2000) Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). Proc R Soc B-Biol Sci 267:1657–1662

Surbida KL, Wright JC (2001) Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). Physiol Biochem Zool 74:894–906

Takeda N (1984) The aggregation phenomenon in terrestrial isopods. Symp Zool Soc Lond:381–404

Therneau TM (2015) coxme: mixed effects cox models. R package version 22–4 http://cran.r-project.org/package=coxme

Tregenza T, Wedell N (2000) Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. Mol Ecol 9:1013–1027

Tregenza T, Wedell N (2002) Polyandrous females avoid costs of inbreeding. Nature 415:71–73

Trivers RL (1972) Parental investment and sexual selection. In: Campbell B (ed) Sexual selection and the descent of man. Aldine, Chicago, IL, pp 136–179

Valette V, Durand S, Bech N, Grandjean F, Beltran-Bech S (2017) Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with Wolbachia? J Evol Biol 30:235–243

Vandel A (1962) Faune de France 66, Isopodes Terrestres (Deuxième Partie). Paul Lechevalier edn, Paris

Venables WN, Ripley BD (2002) Modern applied statistics with S, Fourth edn. Springer edn, New York http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/

Verne S, Puillandre N, Brunet G, Gouin N, Samollow PB, Anderson JD, Grandjean F (2006) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Mol Ecol Notes 6:328–330

Wang JL (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. Genetics 160:1203–1215

Wedell N (1997) Ejaculate size in bushcrickets: the importance of being large. J Evol Biol 10:315–325

Weeks SC, Reed SK, Ott DW, Scanabissi F (2009) Inbreeding effects on sperm production in clam shrimp (*Eulimnadia texana*). Evol Ecol Res 11:125–134

Yasui Y (1998) The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. Trends Ecol Evol 13:246–250

Zeh JA, Zeh DW (1996) The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. Proc R Soc B-Biol Sci 263: 1711–1717

Zhang HY, He H, Chen LB, Li L, Liang MZ, Wang XF, Liu XG, He GM, Chen RS, Ma LG, Deng XW (2008) A genome-wide transcription analysis reveals a close correlation of promoter INDEL polymorphism and heterotic gene expression in rice hybrids. Mol Plant 1: 720–731

Ziegler A, Suzuki S (2011) Sperm storage, sperm translocation and genitalia formation in females of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Peracarida, Isopoda). Arthropod Struct Dev 40: 64–76

Appendix 1 Microsatellite amplification and genotyping

Eleven microsatellite markers were used and gathered into three multiplexes (Table S1) (Verne et al. 2006; Giraud et al. 2013). The forward primer of each primer pair was fluorescein labelled. Primer mix for each multiplex was constituted of 2µM of each primer, 10mM TrisHCl and 1mM EDTA. PCR reactions were performed with the QIAGEN Multiplex PCR kit, in 5µL of QIAGEN Master Mix, 1µL of primer mix, 1µL of extracted DNA and 3µL of RNase-free water. The BioRad thermocycler program was as follow: 95°C for 15 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 90 s, and 72°C for 60 s, with a last extension step at 60°C for 30 min.

Table S1 Characteristics of the markers used in our study

Locus	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Multiplex	Dye	Size range (bp)	Ho	Allele number
Av1*	DQ234304	F: TGGAGTCAACTCACATTCTG R: TGTCTGTAAAACTTGTGCTACG	1	6-FAM	107-115	0.617	5
Av2*	DQ234305	F: TGAAGTTCGGGTGAATTGTG R: ATACCATGACGTGTCGCAAG	1	6-FAM	156-164	0.475	4
Av4*	DQ234307	F: CCGAACCTTTCGAAGGTATT R: AAGGCACATAACATTTTCACAAA	1	6-FAM	188-246	0.467	5
Av5*	DQ234308	F: CGTGCGAAGTTCAGATTCTTT R: GCGCGCTCGAGGATTTAC	1	6-FAM	261-309	0.775	6
Av9*	DQ234312	F: TCTCGAAGAATTGCCTCACA R: CGATGACTGGGACAATCTCA	1	HEX	196-202	0.200	3
Av6*	DQ234309	F: GGAATGAGGTCGTCGACTATG R: GTCTTTCAAACGGGCACAAT	2	6-FAM	169-175	0.492	3
Av3*	DQ234306	F: TGAGTCTCATTATAGTTTGGATGA R: TCCTCTCTATACCCCATAATTTCA	2	6-FAM	190-226	0.683	8
Av56†	10.5061/dryad.md545	F: TTCAAAGGAGCGTTTGACCT R: AACCACAGCAACAACAGCAG	3	6-FAM	203-224	0.725	5
Av18†	10.5061/dryad.md545	F: GAAGAAATTCAAACTTCACCATC R: CTTTGAACAGACTTACGAATAACATC	3	HEX	100-124	0.525	3
Av32†	10.5061/dryad.md545	F: TTTCAACCTTCCTAACCAAACC R: TTGTTTTATATCCACGACCATCC	3	NED	87-113	0.608	6
Av63†	10.5061/dryad.md545	F: CAAAACATCTGTACGGATTCCC R: GCCAAACATAAATGCTCGCT	3	NED	133-145	0.125	2

* Marker developed by Verne et al. (2006), † marker developed by Giraud et al. (2013). Ho: observed heterozygosity.

PCR products were separated along with the size standard GeneScan™ 500 ROX™ (Applied Biosystems) using an Applied Biosystem 310 Avant automated sequencer. Product size was then determined with the GeneMapper software v3.7 (Applied Biosystems).

Appendix 2 Correlations between variables that were simultaneously included in models

Table S2 Pairwise correlations between explanatory variables. For all variables, N = 28 (number of crosses), except for variables *r* and H for which N = 56 (number of males). Above diagonal: Pearson r; below diagonal: p-value

	HF	**HM1**	**HM2**	***r*M1**	***r*M2**	**ΔH**	**Δ*r***	**H**	***r***
HF		0.25	0.06	-0.23	-0.01	-0.13	0.14		
HM1	0.2		0.02	-0.07	-0.08	-0.68	-0.03		
HM2	0.76	0.92		-0.1	-0.17	0.71	-0.09		
***r*M1**	0.24	0.74	0.6		-0.04	-0.03	-0.41		
***r*M2**	0.98	0.69	0.4	0.2		-0.07	0.78		
ΔH	0.51	<0.001	<0.001	0.88	0.73		-0.04		
Δ*r*	0.47	0.87	0.65	0.03	<0.001	0.83			
H									-0.15
r								0.28	

Appendix 3 Full and minimal models used in this study

Table S3 Full models constructed in our study and associated minimal models resulting from the removal of non significant terms from the full models.

Paragraph in the result section	Dependent variable	Subset on which analysis was performed	Type of model	Explanatory variable (standardised)	β	exp(β)	SE	p
2	paternity of each offspring	all broods	full	H	0.32	1.38	0.05	<0.001
				r	-0.10	0.91	0.06	0.09
			minimal	H	0.32	1.38	0.05	<0.001
2	paternity of each offspring	broods with multiple paternity	full	H	0.21	1.24	0.09	0.02
				r	-0.03	0.97	0.08	0.68
			minimal	H	0.23	1.26	0.09	0.008
3	total brood size	all broods	full	HF	0.04	1.04	0.05	0.41
				HM1	0.02	1.02	0.05	0.7
				HM2	-0.02	0.98	0.05	0.65
				*r*M1	-0.11	0.90	0.06	0.07
				*r*M2	-0.09	0.91	0.04	0.03
			minimal	*r*M1	-0.12	0.89	0.06	0.049
				*r*M2	-0.08	0.92	0.04	0.042

Appendix 4 Summary of characteristics for all crosses performed between one female and two males.

Table S4a Analyzed broods (N=28)

Cross ID	HF	HM	Hm	*r*M	*r*m	meanH	mean*r*	ΔH	Δ*r*	Brood size	M offspring	m offspring
01	0.36	0.55	0.55	0.19	0.22	0.55	0.21	0	0.03	75	17	13
02	0.27	0.45	0.36	0.1	-0.28	0.41	-0.09	-0.09	-0.38	73	20	9
03	0.45	0.55	0.55	-0.05	-0.02	0.55	-0.03	0	0.02	106	19	10
06	0.55	0.45	0.36	0.12	-0.18	0.41	-0.03	-0.09	-0.3	98	26	3
07	0.45	0.73	0.64	-0.26	-0.09	0.68	-0.17	-0.09	0.17	100	19	10
08	0.36	0.73	0.36	-0.09	-0.85	0.55	-0.47	-0.36	-0.76	172	30	0
09	0.55	0.73	0.36	-0.64	-0.03	0.55	-0.33	-0.36	0.61	126	30	0
10	0.36	0.36	0.64	-0.17	0.22	0.5	0.02	0.27	0.39	104	30	0
12	0.55	0.45	0.36	-0.22	-0.21	0.41	-0.21	-0.09	0.01	186	29	0
15	0.45	0.45	0.55	-0.1	-0.69	0.5	-0.39	0.09	-0.59	183	23	7
16	0.36	0.55	0.27	0.02	0.23	0.41	0.12	-0.27	0.2	70	21	8
18	0.18	0.36	0.45	-0.11	0.09	0.41	-0.01	0.09	0.19	100	28	0
19	0.18	0.45	0.82	-0.31	-0.45	0.64	-0.38	0.36	-0.14	138	21	8
20	0.36	0.36	0.45	0.33	0.02	0.41	0.17	0.09	-0.32	61	26	0
21	0.45	0.27	0.36	-0.38	0.35	0.32	-0.02	0.09	0.74	123	25	4
22	0.64	0.64	0.36	-0.17	0.63	0.5	0.23	-0.27	0.8	112	18	12
24	0.55	0.64	0.36	0.05	0.2	0.5	0.13	-0.27	0.14	125	29	0
27	0.45	0.55	0.45	0.16	0.1	0.5	0.13	-0.09	-0.06	125	30	0
28	0.55	0.64	0.64	0.12	0.22	0.64	0.17	0	0.09	101	25	2
30	0.45	0.64	0.18	-0.06	0.18	0.41	0.06	-0.45	0.25	179	25	4
31	0.82	0.55	0.45	-0.43	-0.79	0.5	-0.61	-0.09	-0.36	124	30	0
32	0.55	0.73	0.64	-0.09	-0.08	0.68	-0.08	-0.09	0.01	128	30	0
33	0.55	0.91	0.73	-0.17	-0.05	0.82	-0.11	-0.18	0.12	116	30	0
34	0.55	0.64	0.64	-0.2	-0.01	0.64	-0.1	0	0.19	109	17	12
35	0.73	0.55	0.82	0.27	-0.3	0.68	-0.02	0.27	-0.03	163	30	0
37	0.55	0.73	0.27	-0.14	-0.01	0.5	-0.07	-0.45	0.13	71	30	0
38	0.27	0.73	0.36	-0.49	-0.41	0.55	-0.45	-0.36	0.07	147	30	0
40	0.55	0.27	0.55	-0.54	-0.08	0.41	-0.31	0.27	0.46	109	30	0
mean±se	*0,47±0,03*	*0,56±0,03*	*0,48±0,03*	*-0,14±0,04*	*-0,07±0,06*	*0,52±0,02*	*-0,10±0,04*	*-0,07±0,04*	*0,06±0,07*	*118,71±6,56*	*25,64±0,90*	*3,64±0,88*

HF= Female heterozygosity, HM=Major male heterozygosity, Hm=Minor male heterozygosity, rM=Major male genetic similarity to the female, rm=Minor male genetic similarity to the female, meanH=Mean male heterozygosity, meanr=Mean male genetic similarity to the female, ΔH=Difference in male heterozygosity, Δr=Difference in male genetic similarity to the female, M offspring =Number of offspring assigned to the major male, m offspring=Number of offspring assigned to the minor male.

Table S4b Non analyzed broods (N=12)

Cross ID	HF	Ha	Hb	*r*a	*r*b	meanH	mean*r*	|ΔH|	|Δ*r*|	Brood size	Outcome of cross
04	0.45	0.55	0.55	-0.04	-0.04	0.55	-0.04	0	0	-	female death
05	0.64	0.64	0.45	0.36	0.08	0.55	0.22	0.18	0.28	-	no gravidity of female
11	0.45	0.55	0.64	-0.06	-0.32	0.59	-0.19	0.09	0.27	124	no paternity assigned
13	0.64	0.55	0.73	0.16	-0.31	0.64	-0.08	0.18	0.47	96	no paternity assigned
14	0.27	0.64	0.64	-0.18	0.28	0.64	0.05	0	0.45	82	no paternity assigned
17	0.27	0.64	0.64	-0.3	-0.17	0.64	-0.24	0	0.12	93	no paternity assigned
23	0.64	0.45	0.45	-0.43	-0.11	0.45	-0.27	0	0.32	-	abortion
25	0.36	0.64	0.45	-0.01	-0.35	0.55	-0.18	0.18	0.34	-	abortion
26	0.55	0.55	0.45	0.31	0.41	0.5	0.36	0.09	0.1	-	abortion
29	0.64	0.64	0.73	0.22	0.3	0.68	0.26	0.09	0.08	-	abortion
36	0.45	0.36	0.55	-0.09	-0.21	0.45	-0.15	0.18	0.13	-	female death
39	0.64	0.64	0.73	0.02	-0.25	0.68	-0.11	0.09	0.27	-	female death
mean±se	*0,47±0,02*	*0,56±0,02*	*0,51±0,02*	*-0,10±0,04*	*-0,07±0,05*	*0,54±0,02*	*-0,08±0,04*	*0,16±0,02*	*0,26±0,03*	*98,75±8,94*	-

As there were no major or minor males for these twelve crosses, males were randomly named a and b. For the same reason, the absolute value of difference in heterozygosity and in genetic similarity to the female is given as the sign of the difference would have no meaning. HF=Female heterozygosity, Ha=male a heterozygosity, Hb=male b heterozygosity, ra=male a genetic similarity to the female, rb=male b genetic similarity to the female, meanH=Mean male heterozygosity, meanr=Mean male genetic similarity to the female, |ΔH|=Absolute value of difference in male heterozygosity, |Δr|=Absolute value of difference in male genetic similarity to the female.

D.Des indices sur l'effet de l'ordre d'accouplement

Nous avons pu mettre en évidence un effet positif de l'hétérozygotie des mâles ainsi que de leur dissimilarité à la femelle sur leur succès de paternité. Cependant, notre protocole ne donnait pas accès à l'ordre des accouplements, paramètre pouvant pourtant s'avérer important dans le succès de reproduction. En effet, d'après l'hypothèse du *trade-up*, les femelles pourraient recourir à la l'accouplement multiple dans le cas où elles rencontrent un nouveau partenaire meilleur que le premier mâle avec lequel elles se sont accouplées (Yasui, 1998). Cette situation est parfaitement illustrée chez le schistosome *Schistosoma mansoni* où les femelles changent de partenaire sexuel quand elles ont accès à un mâle leur étant génétiquement plus dissimilaire que le premier (Beltran *et al.*, 2008). Contrôler l'ordre d'accouplement dans des expériences sur l'effet de la diversité génétique dans la sélection sexuelle serait un moyen adapté de vérifier cette hypothèse de *trade-up*.

Il se trouve qu'une expérience que nous avons menée au laboratoire hors du strict contexte de ma thèse a permis d'obtenir, sinon une confirmation, en tout cas des indices concernant cette hypothèse. Cette étude, intitulée « When GIS zooms in: Spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare* » présentée en annexe 2 et pour laquelle je suis co-auteur, a été publiée dans la revue *Genetica* en 2017 (Bech *et al.*, 2017). Elle vise à tester une approche novatrice : la méthode de cartographie par SIG (Système d'Information Géographique) a été appliquée à une échelle microscopique, à savoir celle du *marsupium* de *A vulgare*. L'objectif est la cartographie des descendants issus d'accouplements multiples selon l'identité de leurs pères au sein du *marsupium* en fonction de l'ordre d'accouplement (**Figure 7**). Des analyses de paternité ayant été réalisées avec les marqueurs microsatellites que nous utilisons, l'effet des caractéristiques génétiques (hétérozygotie et similarité génétique à la femelle) des pères a également pu être testé. Trois femelles vierges en début de plaques blanches (dites femelles expérimentales) ont ainsi été présentées successivement à quatre mâles chacune (soit 12 mâles en tout), chaque mâle étant placé pendant 24h avec la femelle afin de permettre d'accouplement. Les femelles gravides ont ensuite été sacrifiées peu avant la naissance des jeunes pour cartographier leur descendance. Une quatrième femelle a servi de contrôle positif pour la paternité multiple. Cette dernière était une femelle ayant produit une portée possédant deux pères lors

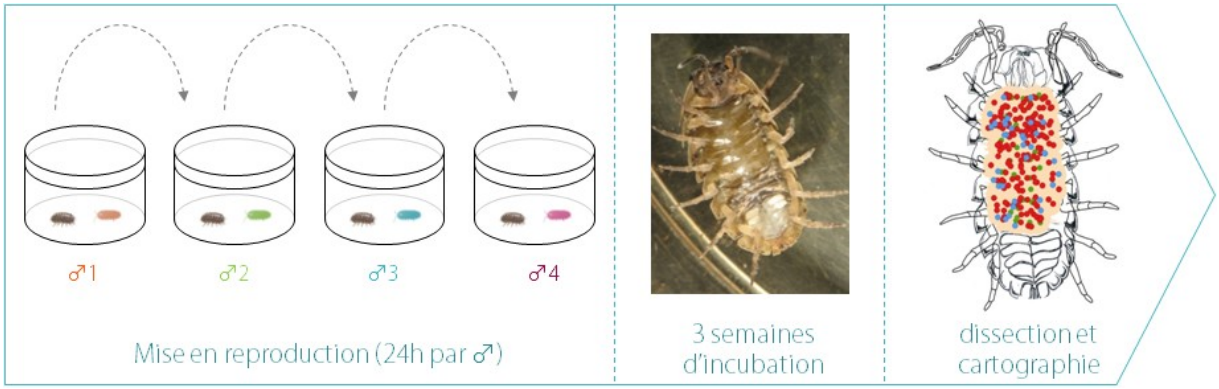

Figure 7 Schéma du protocole expérimental de cette étude, appliqué chez trois femelles.

de notre expérience sur le succès de paternité et ayant réalisé une deuxième mue parturielle. Elle nous a permis dans cette expérience de tester une première fois la méthode de dissection et de cartographie à cette échelle physiologique.

Dans les trois cas, les femelles expérimentales se sont accouplées avec le premier mâle qui leur a été présenté. Cela suggère qu'elles acceptent facilement l'accouplement avec un mâle seul, et va dans le sens de précédentes observations où 90% des femelles vierges acceptent un accouplement (Moreau *et al.*, 2002). Seule une femelle sur les trois a produit une descendance avec deux pères. Elle s'est en effet accouplée avec le troisième mâle qui lui a été proposé, mâle étant par ailleurs le plus hétérozygote de tous les partenaires proposés à cette femelle. Pour les deux autres femelles présentant une portée avec un seul père, le hasard a fait que le premier mâle présenté (le père) est également le plus hétérozygote. Ainsi, pour les trois femelles testées, dans un premier temps, c'est le premier mâle qui accède à la reproduction, puis il semblerait qu'il n'y ait ré-accouplement que si un mâle plus hétérozygote que le premier mâle est proposé à la femelle. Cela serait cohérent avec le meilleur succès de paternité des mâles les plus hétérozygotes observé dans l'article précédent (Durand *et al.*, 2017). Cela va également dans le sens de l'hypothèse selon laquelle les femelles se reproduisent avec un deuxième mâle uniquement si le premier est de moins bonne qualité, et ce, si l'hétérozygotie du mâle reflète une bonne qualité. Bien entendu, l'effectif de trois femelles est ici largement insuffisant pour conclure de façon statistique, ce protocole ayant été élaboré en fonction des contraintes techniques relatives à la cartographie. Ces résultats sont cependant encourageants et suggèrent que l'ordre d'accouplement pourrait être un facteur crucial dans la détermination du succès reproducteur des mâles.

E. Conclusion du chapitre I

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence une préférence précopulatoire du mâle pour la dissimilarité génétique des femelles disponibles, préférence conditionnée par un écart suffisamment important entre les femelles sur ce paramètre génétique (Durand *et al.*, 2015). Par ailleurs, les mâles les plus dissimilaires obtiennent un meilleur succès de paternité lorsque les portées ne possèdent qu'un seul père (Durand *et al.*, 2017). Ces éléments suggèrent la présence d'un choix pour un partenaire génétiquement dissimilaire, vraisemblablement adaptatif au vu du faible nombre de descendants obtenus pour les parents les plus similaires. Par ailleurs, les mâles les plus hétérozygotes ont un meilleur succès de paternité quel que soit le nombre de pères dans la portée. L'hétérozygotie est donc susceptible de conférer un avantage aux mâles en contexte de compétition mâle-mâle ou bien de choix femelle. La discussion générale de ce manuscrit permettra de relier ces résultats à ceux des deux autres chapitres.

CHAPITRE II : ETUDE DES STRATÉGIES D'APPARIEMENT, VERS LES CONDITIONS NATURELLES

A.Introduction

Le premier chapitre de ce manuscrit nous a permis de mettre en évidence des effets de la diversité génétique sur la sélection sexuelle (choix de partenaire et/ou compétition entre mâles). Dans les deux études présentées, la situation était simplifiée au maximum : le sexe placé en situation de choix était toujours présenté à deux partenaires sexuels seulement. Cela permettait de limiter les effets confondants dans l'étude des stratégies d'appariement et des choix de partenaires. Or, en conditions naturelles, un plus grand nombre de partenaires sexuels et de compétiteurs sont généralement disponibles. Cela est particulièrement vrai chez le cloporte de par son mode de vie grégaire (Takeda, 1984). Une étude sur des populations californiennes a par exemple relevé une densité moyenne de 538 cloportes au mètre carré chez *A. vulgare* (Paris & Pitelka, 1962). Dans ces conditions, la sélection sexuelle s'exerce vraisemblablement de façon plus intense que dans nos conditions expérimentales simplifiées. Il convient alors de s'interroger sur la persistance des résultats obtenus en conditions simplifiées lorsque l'on augmente le nombre d'individus présents et donc qu'on ajoute des interactions avec des congénères et de même sexe et de sexe opposé dans le système. En particulier, il peut être attendu que les phénomènes de paternité multiple observés en condition simplifiée soient affectés par la disponibilité en partenaires et l'intensité de la compétition mâle-mâle.

Par ailleurs, il faut également tenir compte du fait que les expériences en laboratoire se déroulent en conditions standardisées, les animaux utilisés étant vierges et âgés d'un an. Les stress d'origine thermique, hydrique, nutritive ou prédatoire sont minimisés ou inexistants. Tous ces facteurs sont susceptibles de varier en populations naturelles, ainsi que d'influencer l'effet de la sélection sexuelle à un instant *t* (Kvarnemo & Simmons, 1999; Robinson *et al.*, 2012).

Ainsi, nous avons souhaité nous rapprocher au maximum des conditions naturelles afin de mieux comprendre, de façon plus intégrée, le système d'appariement chez notre organisme d'intérêt et de vérifier si les résultats du précédent chapitre sont altérés ou non par des conditions plus proches de celles rencontrées dans la nature par cette espèce. Le présent chapitre comporte ainsi deux parties principales, toutes deux basées sur des analyses de paternité à l'aide de marqueurs microsatellites. Dans un premier temps, la présence de paternité multiple est recherchée dans une population naturelle à travers l'étude de la descendance de femelles gravides récoltées sur le terrain. Ensuite, une expérience en laboratoire vise à mettre en relation le succès reproducteur avec les caractéristiques génétiques en manipulant le nombre de partenaires potentiels et de compétiteurs. Ainsi, un effet du sex-ratio, paramètre important dans la direction et l'intensité de la compétition sexuelle, est également étudié.

B. Paternité multiple en populations naturelles

L'étude à suivre est issue de travaux communs réalisés dans le contexte de ma thèse ainsi que celle de V. Valette (2015). Ces travaux ont donné lieu à un article de recherche publié dans la revue *Journal of Evolutionary Biology*, dont V. Valette et moi-même sommes co-premiers auteurs (Valette *et al.*, 2017).

I. Présentation de l'étude

La paternité multiple est l'un des différents mécanismes pouvant conduire à une optimisation de la diversité génétique des descendants pour les femelles (Tregenza & Wedell, 2002; Kempenaers, 2007). Chez *A. vulgare*, des accouplements multiples avec des mâles présentés successivement aux femelles ont déjà été mis en évidence en laboratoire (Moreau *et al.*, 2002; Verne *et al.*, 2007b), et les travaux réalisés au cours de cette thèse confirment la présence de paternité multiple quand les mâles sont présentés simultanément aux femelles (Durand *et al.*, 2017). Cependant, la présence et la fréquence de tels comportements dans les populations naturelles restent jusqu'ici inconnues. Ce phénomène d'appariement multiple pourrait par ailleurs être influencé par la présence de la bactérie féminisante *Wolbachia* (**encadré 3**). En effet, *Wolbachia* modifie le sex-ratio en faveur des femelles et diminue ainsi le nombre de mâles disponibles à l'échelle de la population (Bouchon *et al.*, 1998). De plus, chez *A. vulgare*, les mâles préfèrent les femelles non infectées aux femelles infectées (Moreau *et al.*, 2001), ce qui suggère que les femelles infectées pourraient avoir moins de partenaires. Enfin, différentes souches de *Wolbachia* sont connues pour infecter *A. vulgare* (Cordaux *et al.*, 2004) et diffèrent en termes de taux de transmission et de virulence (Braquart-Varnier *et al.*, 2008). On pourrait donc s'attendre à un impact différent des souches de *Wolbachia* sur la fréquence des accouplements multiples chez *A. vulgare*.

Encadré 3 : Symbiose avec Wolbachia

Les isopodes terrestres sont connus pour héberger l'endosymbionte *Wolbachia* (Cordaux *et al.*, 2012). Cette alpha-protéobactérie à Gram négatif est très répandue chez les arthropodes et infecte également des nématodes. *Wolbachia* est largement étudiée de par sa nature de parasite de la reproduction. En effet, étant transmise de façon verticale de la mère aux descendants, manipuler la reproduction de son hôte lui permet d'augmenter sa propre transmission. *Wolbachia* est ainsi capable, selon les hôtes qu'elle infecte, de réduire la production de mâles en induisant une mortalité des embryons mâles, d'induire de la parthénogenèse thélytoque, de contrôler la production d'ovocytes, d'induire de l'incompatibilité cytoplasmique ou de féminiser les mâles génétiques (Werren *et al.*, 2008).

Les souches de *Wolbachia* présentes chez les isopodes terrestres induisent de l'incompatibilité cytoplasmique ou de la féminisation (Bouchon *et al.*, 2008). Chez *A. vulgare* en particulier, un effet féminisant a été démontré pour les souches *w*VulC et *w*VulM (Cordaux *et al.*, 2004), et est fortement soupçonné pour la souche *w*VulP découverte plus récemment (Verne *et al.*, 2007a). Cependant, le mode d'action précis par lequel *Wolbachia* interfère avec le déterminisme génétique du sexe reste encore à décrypter et est très étudié au laboratoire. Chez les mâles génétiques (chez *A. vulgare*, les mâles sont homogamétiques ZZ et les femelles hétérogamétiques ZW) asymbiotiques, la glande androgène produit l'hormone androgène au cours du développement post-embryonnaire, ce qui conduit à la différenciation en mâle. *Wolbachia* féminise les mâles en inhibant la différenciation de cette glande androgène chez les mâles génétiques, mais nous ignorons à ce jour sa cible précise (Bouchon *et al.*, 2008).

La féminisation a pour conséquence évidente un biais de sex-ratio dans les portées des femelles infectées. Ce biais de sex-ratio se retrouve à l'échelle populationnelle (Juchault *et al.*, 1993; Verne *et al.*, 2012), même s'il faut également prendre en compte la présence de l'élément f, un autre facteur féminisant chez *A. vulgare*, qui correspond à l'insertion d'un fragment du génome de *Wolbachia* dans celui de son hôte (Leclercq *et al.*, 2016). Or les biais de sex-ratio sont connus pour impacter la taille efficace des populations et ont donc une incidence sur le maintien de la diversité génétique (Wright, 1931). Le sex-ratio influence également le nombre de partenaires sexuels disponibles pour chaque sexe, ce qui peut impacter les processus de sélection sexuelle (Kvarnemo & Ahnesjo, 1996).

Wolbachia est connue pour avoir un impact sur les traits de vie d'*A. vulgare*. En effet, la présence de la souche *w*VulC réduit la longévité de son hôte (Braquart-Varnier *et al.*, 2008). En revanche, elle lui confère une protection face à une infection bactérienne pathogène se traduisant par une meilleure survie des individus infectés par *Wolbachia* (Braquart-Varnier *et al.*, 2015). De plus, la présence de *Wolbachia* dans notre modèle est associée à des modifications dans l'expression de gènes

de l'immunité (Chevalier *et al.*, 2012). Enfin, comparés aux femelles symbiotiques, les femelles porteuses de *Wolbachia* présentent une plus forte septicémie naturelle (Braquart-Varnier *et al.*, 2008), ainsi qu'une densité hémocytaire plus faible, en tout cas chez les animaux âgés (Braquart-Varnier *et al.*, 2008; Sicard *et al.*, 2010).

Divers traits liés à la reproduction sont également affectés par *Wolbachia* dans notre modèle d'étude, tels que l'investissement reproducteur. Cela étant dit, ces effets ne sont pas encore clairement caractérisés et dépendent apparemment du fond génétique de l'hôte isopode. Il a par exemple été montré que chez les femelles symbiotiques à *Wolbachia,* la fécondité* et le diamètre des œufs pondus sont moindres que chez les femelles asymbiotiques pour un fond génétique quasi-commun correspondant à des animaux prélevés à Nice (Moreau, 2001). Par ailleurs, un travail de thèse effectué au laboratoire par M. Lachat (2009) sur une lignée prélevée en forêt de Chizé indique que la souche *w*VulC augmente le nombre et la taille des portées viables. Cependant, une autre thèse plus récente réalisée par M. Fortin (2016) sur une lignée de cloportes prélevée au Danemark suggère quant à elle que *w*VulC diminue la taille des portées. Le comportement sexuel est également affecté par la présence de *Wolbachia*. Des tests de choix effectués en laboratoire ont ainsi montré que les mâles réalisent plus de tentatives d'accouplement avec les femelles asymbiotiques qu'avec les femelles symbiotiques, et que les femelles asymbiotiques reçoivent plus de spermatozoïdes (Moreau *et al.*, 2001). Les femelles symbiotiques présentent également des comportements inadaptés conduisant à l'interruption précoce de la séquence copulatoire (Moreau *et al.*, 2001).

Afin de vérifier ces hypothèses, des femelles gravides de différents statuts d'infection ont été collectées dans la forêt de Chizé (Deux-Sèvres) en 2004. Nous avons ainsi obtenu 8 femelles non infectées, 5 femelles infectées par *w*VulC (souche virulente) et 10 femelles infectées par *w*VulM (souche moins virulente). Des analyses de paternité ont ensuite été réalisées sur 20 descendants par portée à l'aide de marqueurs microsatellites (**Figure 8**).

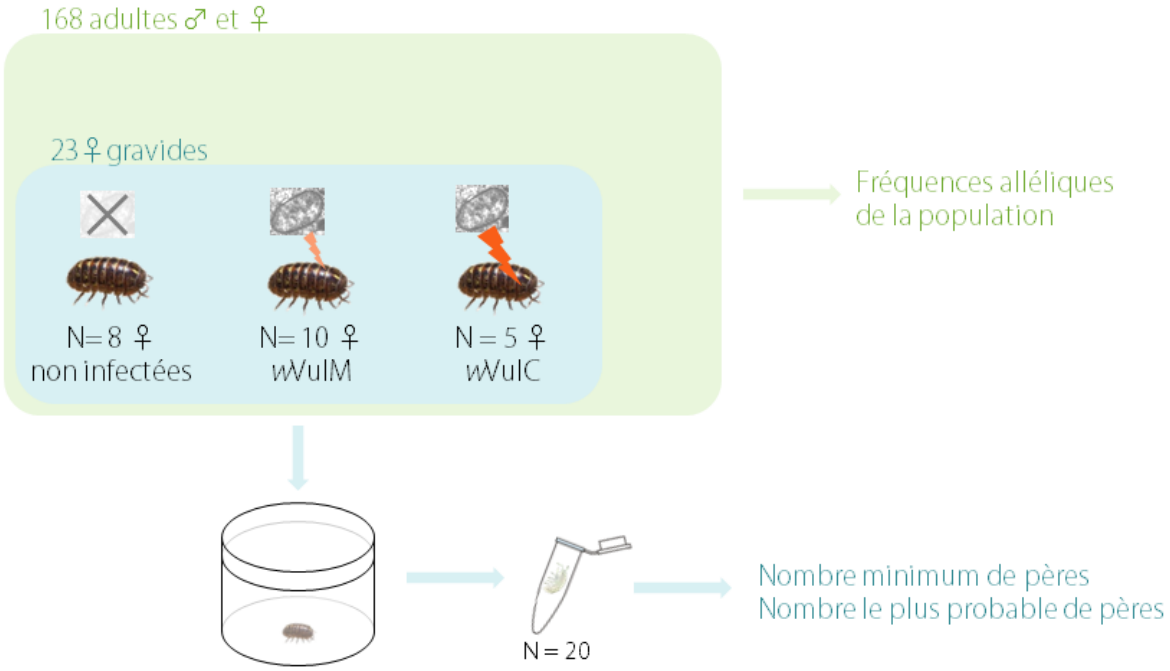

Figure 8 Schéma du protocole de cette étude. Dans la Réserve Biologique Intégrale de Chizé, 168 adultes *A. vulgare* ont été prélevés. Parmi ces individus, 23 femelles gravides ont été élevées en laboratoire jusqu'à la naissance de leurs descendants. Des analyses de paternité sur 20 d'entre eux ont été réalisées pour déterminer le nombre de pères pour chaque portée. Ceci a été rendu possible grâce aux fréquences alléliques populationnelles estimées à partir des 168 adultes collectés.

Le logiciel GERUD nous a permis de déterminer le nombre minimum de pères dans chaque portée, nous permettant d'affirmer que l'ensemble des portées possède plusieurs pères de façon certaine, à l'exception d'une seule portée pour laquelle un seul père pourrait expliquer l'ensemble des génotypes observés chez les descendants. Par la suite, nous avons obtenu le nombre le plus vraisemblable de pères grâce au logiciel COLONY, avec une moyenne de 4.48 ± 1.24 pères par portée sur l'ensemble des femelles testées. Ce paramètre est dépendant du statut d'infection des femelles, puisque les femelles *w*VulC produisent des portées avec moins de pères que les femelles non infectées et infectées par *w*VulM (figure 1, page 6 de la publication). Enfin, l'hétérozygotie observée des descendants ayant été mesurée en parallèle, nous avons pu montrer que ce paramètre ne dépend ni du statut d'infection de la mère, ni du nombre de pères le plus vraisemblable.

Ainsi, notre étude a permis de mettre en évidence l'omniprésence de la paternité multiple chez *A. vulgare* en populations naturelles. En ce qui concerne l'effet de *Wolbachia* sur ce phénomène, le

nombre de pères plus faible chez les femelles *w*VulC pourrait être expliqué par une histoire évolutive plus courte de *A. vulgare* avec *w*VulC comparé à *w*VulM, qui pourrait conduire à une préférence des mâles pour les femelles *w*VulM et non infectées par rapport aux femelles *w*VulC. Une hypothèse alternative est que les femelles infectées par la souche virulente *w*VulC investiraient moins dans la reproduction que les femelles d'autres statuts d'infection afin d'augmenter le budget énergétique nécessaire à leur immunité.

Nous n'avons pas pu mettre l'intensité de la paternité multiple en relation avec l'hétérozygotie des portées. Il se peut que notre échantillonnage ne soit pas suffisant pour détecter un tel effet. Une autre possibilité est que l'hétérozygotie des descendants résulte principalement des génotypes des mâles impliqués, indépendamment de leur nombre. Cependant, il est également envisageable que des biais de paternité en faveur des mâles les moins similaires génétiquement ou les plus hétérozygotes puissent conduire à une optimisation de l'hétérozygotie des portées chez *A. vulgare*. Cette dernière hypothèse est à mettre en parallèle avec les résultats observés précédemment (Durand *et al.*, 2017), où les mâles les plus dissimilaires n'obtiennent pas un meilleur succès en cas de paternité multiple, contrairement aux mâles les plus hétérozygotes. Dans ce contexte, il pourrait être judicieux de prendre en compte d'autres facteurs tels que les caractéristiques génétiques des pères, et en particulier leur hétérozygotie, afin d'étudier les bénéfices potentiels sur la diversité des descendants pour les femelles accouplées avec plusieurs mâles. Nous avons ainsi réalisé une étude expérimentale pour répondre à cette problématique, étude présentée en partie C du présent chapitre.

II. Publication "Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*?" Journal of Evolutionary Biology 30 : 235-243 (2017)

JOURNAL OF Evolutionary Biology eseb European Society for Evolutionary Biology

doi: 10.1111/jeb.13009

Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*?

V. VALETTE[1], S. DURAND[1], N. BECH, F. GRANDJEAN[2] & S. BELTRAN-BECH[2]

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe 'Ecologie, Evolution, Symbiose', Université de Poitiers, Poitiers, France

Keywords:

Armadillidium vulgare;
infection;
microsatellite markers;
multiple paternity;
Wolbachia.

Abstract

Female multiple mating has been extensively studied to understand how nonobvious benefits, generally thought to be of genetic nature, could overcome heavy costs such as an increased risk of infection during mating. However, the impact of infection itself on multiple mating has rarely been addressed. The interaction between the bacterium *Wolbachia* and its terrestrial crustacean host, *Armadillidium vulgare*, is a relevant model to investigate this question. In this association, *Wolbachia* is able to turn genetic males into functional females (i.e. feminization), thereby distorting the sex ratio and decreasing the number of available males at the population scale. Moreover, in *A. vulgare*, females have been shown to mate multiply under laboratory conditions and males prefer uninfected females over infected ones. Additionally, different *Wolbachia* strains are known to infect *A. vulgare* and these strains differ in their transmission rate and virulence. All these elements suggest a potential impact of different *Wolbachia* strains on multiple mating. To investigate this assumption, we collected gravid females in a wild *A. vulgare* population harbouring both uninfected females and females infected with one of two different *Wolbachia* strains (*w*VulM and *w*VulC) and performed paternity analyses on the obtained broods using microsatellite markers. We demonstrate that (i) multiple paternity is common in this wild population of *A. vulgare*, with a mean number of fathers of 4.48 ± 1.24 per brood and (ii) females infected with *w*VulC produced broods with a lower multiple paternity level compared with females infected with *w*VulM and uninfected ones. This work improves our knowledge of the impact of infections on reproductive strategies.

Introduction

Promiscuity is a mating system in which individuals of both sexes mate with several partners during the same reproductive period. The question of the benefits of multiple mating for both sexes has been extensively studied (Reynolds, 1996; Jennions & Petrie, 2000). For males, these benefits are obvious, as the number of offspring increases with fecundation success and thus with the number of partners (Bateman, 1948). For females, however, benefits of multiple mating remain unclear, as only one male is generally sufficient to ensure fecundation of all oocytes. Two kinds of benefits resulting from multiple mating have been proposed for females: (i) direct benefits related to better resources provided by males to the female or the offspring (Arnqvist & Nilsson, 2000) and (ii) indirect benefits, also called genetic benefits, leading to offspring of better genetic quality (Yasui, 1998; Jennions & Petrie, 2000). Besides these benefits, multiple mating increases the costs incurred by mating (Pomiankowski, 1987): it enhances predation risk during the search for a partner and mating (Rowe, 1994), risk of injury during mating (Chapman *et al.*, 1995) and risk of acquiring a sexually transmitted disease (Thrall *et al.*, 2000), which in turn could affect reproductive behaviour.

Correspondence: Sophie Beltran-Bech, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe 'Ecologie, Evolution, Symbiose', Université de Poitiers, F-86073 Poitiers, France.
Tel.: +33 5 49 36 64 08; fax: +33 5 49 45 40 15;
e-mail: sophie.beltran@univ-poitiers.fr
[1]Co-first authors. The two first authors have contributed equally to this work.
[2]Co-last authors. The two last authors have contributed equally to this work.

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.*
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

Parasitic infections are known to influence mate choice (Beltran-Bech & Richard, 2014). Avoidance of mating with infected partners is observed in many species, such as the western mosquito fish *Gambusia affinis* (Deaton, 2009) and *Drosophila melanogaster* (Wittman & Fedorka, 2015), and often leads to an increase in fitness for choosy uninfected individuals (Beltran-Bech & Richard, 2014). Moreover, several studies have shown that infection can alter mate choice and performance of infected individuals compared with healthy ones. Although infections are clearly known to potentially influence mate choice in natural populations, little is known about their effect on multiple mating.

A relevant model to investigate the effect of infections on multiple mating is the widespread alphaproteobacterium *Wolbachia*. This symbiont is well known for its influence on the host and notably on its phenotype, especially through the manipulation of host reproduction (Werren *et al.*, 2008) and in particular for being able to turn genetic males into functional females in some species (i.e. feminization), which enhances its own vertical transmission (Werren *et al.*, 2008). *Wolbachia* can also modulate its host's reproductive behaviour (Farahani *et al.*, 2015) and has been suggested to be involved in the evolution of polyandry in *Drosophila simulans* (Champion de Crespigny *et al.*, 2008). This symbiont is encountered mainly in arthropods, with 40% of all species estimated to be infected (Zug & Hammerstein, 2012).

Several arthropod species are known to display multiple paternity, such as shrimps (Yue & Chang, 2010) or crayfish (Walker *et al.*, 2002). In the *Wolbachia*-harbouring isopod *Armadillidium vulgare*, multiple paternity has been observed in laboratory experiments (Moreau *et al.*, 2002; Verne *et al.*, 2007) and is strongly expected to occur in natural populations as well, although its occurrence is currently unknown. In this species, multiple paternity is possible due to the presence of a seminal receptacle in females which can store spermatozoa after copulation (Suzuki & Ziegler, 2005). These stored spermatozoa can sire offspring even after females have mated again and received sperm from another male (Moreau *et al.*, 2002). However, due to this ability to store spermatozoa, only a single mating is enough to fertilize all the oocytes produced throughout the entire life span of a given female (Howard, 1940).

In *A. vulgare*, we can expect that females infected with *Wolbachia* mate with fewer males than uninfected ones for several reasons. (i) *Armadillidium vulgare* males have been shown to prefer *Wolbachia*-uninfected females rather than infected ones under laboratory conditions (Moreau *et al.*, 2001), potentially leading to a lower number of male copulation attempts for infected females. (ii) The same study highlighted that those infected females display behaviours that can prevent a successful copulation sequence (Moreau *et al.*, 2001). Thus, even with a similar number of mating trials, infected females could have a lower number of successful inseminations compared with uninfected females. Our expectation is supported by a field study on other terrestrial isopod species, in which females that were not mated at the beginning of the reproductive season were likely to be infected with a feminizing *Wolbachia* (Moreau & Rigaud, 2000). Taken together, these elements make plausible a lower multiple mating level for infected females. On the other hand, different *Wolbachia* strains infecting *A. vulgare* have been observed in the wild (Cordaux *et al.*, 2004) and can even co-occur in the same population (Verne *et al.*, 2012; Valette *et al.*, 2013; Dittmer *et al.*, 2014, 2016). In this study, we will focus particularly on the strains *w*VulM and *w*VulC. Both *Wolbachia* strains are able to turn genetic males into functional females (i.e. feminization) in *A. vulgare*, but they differ in their transmission rate (Cordaux *et al.*, 2004) and virulence (Braquart-Varnier *et al.*, 2008). Many cases of trade-offs between immunity and reproduction have been described, especially in invertebrates (Lawniczak *et al.*, 2007; Schwenke *et al.*, 2016). Therefore, assuming that more virulent strains induce a higher physiological cost on females, it can be expected that those females reduce their investment in reproduction (which is usually assumed to be costly for females because of foraging time, assessing potential mates and mating), potentially by mating with fewer males than females infected with less virulent strains or, even more so, uninfected females. Consequently, the coexistence of infection with several different strains within a same natural population is a unique opportunity to investigate the effect of the diversity of a reproductive parasite on multiple mating. By collecting gravid female woodlice in the field from a single population, we used microsatellite molecular markers to perform paternity analyses on broods. Additionally, we compared the number of fathers and each father's contribution to broods according to female infection status.

Materials and methods

Sample collection

Armadillidium vulgare individuals were collected in April 2004, from a population located in the Integral Biological Reserve of Chizé, France (46°07′20.9″N, 0°25′11.3″W), in which different quadrats (5 × 5 m) were defined and sampled. This area is known to present both uninfected and infected individuals with either *w*VulC or *w*VulM *Wolbachia* strains (Verne *et al.*, 2012). In total, 168 adults were collected, including 23 gravid females. Individuals were collected from different quadrats to avoid collecting closely related individuals sharing similar microhabitats. All individuals were stored at −20 °C prior to DNA extraction, except for the gravid females, which were kept alive in individual cylindrical boxes (diameter: 8 cm; height: 5 cm) filled with humid

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

loam. The body size of each gravid female was measured using a graph paper for later analyses. The gravid females were fed *ad libitum* with carrot slices and dried linden leaves and were maintained at a photoperiod of 16 : 8 LD and 20 °C until the emergence of pulli (juvenile woodlice). After the emergence of pulli, each brood was transferred into bigger boxes (26.5 × 13.5 × 6.5 cm) to reduce competition between pulli. After 3 months, 20 pulli from each brood were stored independently at −20 °C until DNA extraction.

Molecular analyses

DNA was extracted from the nerve cord (including the surrounding fat tissue) and the gonads (i.e. utricles for males and ovaries for females) of 628 *A. vulgare* individuals (comprising the 168 adults sampled in the field and 20 pulli from each of the 23 broods) using the phenol–chloroform protocol described in Durand *et al.* (2015). All samples were genotyped using seven highly informative microsatellite markers according to Verne *et al.* (2006) and Giraud *et al.* (2013). All markers were amplified using a Multiplex PCR kit (QIAGEN, Basel, Switzerland). Markers Av2, Av5 and Av9 (Verne *et al.*, 2006) were amplified together in a first multiplex, markers AV0018, AV0056 and AV0032 (Giraud *et al.*, 2013) were amplified together in another multiplex, and Av3 (Verne *et al.*, 2006) was amplified alone (Table 1). All PCRs were carried out according to the manufacturer's standard microsatellite amplification protocol in a final volume of 10 μL and an annealing temperature of 57 °C, as described in Durand *et al.* (2015); 1 μL of PCR product was added to 9 μL formamide and 0.5 μL ROX standard (Life Technologies, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the amplified fragments were separated by electrophoresis on an ABI PRISM R_3130xl® Genetic Analyzer. Fragment size was determined using GeneMapper® version 3.7 (Applied Biosystems), followed by visual verification.

As some DNA samples could not be amplified successfully or produced insufficient electrophoresis profiles, the number of offspring analysed for each brood ranges from 12 to 20 (Table 2). Subsequently, the *Wolbachia* infection status (either uninfected, infected with *w*VulM or with *w*VulC strain) of all gravid females was determined using the detection method described in Valette *et al.* (2013). Thereafter, we noticed that there was no correlation between infection status and quadrats, suggesting a spatially random distribution of females infected by *w*VulC and *w*VulM and uninfected ones. This observation allows us to reject the possibility that females of a same infection status belonged to the same family or that they all lived in the same microhabitat, which could have been confounding effects when studying the effect of infection status.

Population genetic analyses

For each microsatellite marker, Microchecker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) was used to detect null alleles or scoring errors due to stuttering, as this could bias the estimation of the number of fathers involved in the fecundation of each female. The absence of linkage disequilibrium between microsatellite markers was tested using Fstat version 2.9.3 (Goudet, 2001) with 1000 permutations. For this analysis, the significance level was adjusted using a sequential Bonferroni

Table 1 Characteristics of microsatellite markers used in the different multiplexes and singleplex to genotype the *Armadillidium vulgare* individuals.

Locus name	Primer sequences (5′–3′)	Repeat	Annealing temperature (°C)	Size range (bp)	Dye	Multiplex	Reference	PrDM software?
Av2	F*: TGAAGTTCGGGTGAATTGTG R: ATACCATGACGTGTCGCAAG	(CA)9 (CG)3 (CA)2	56	156–176	6-FAM	1	Verne *et al.* (2006)	Yes
Av5	F*: CGTGCGAAGTTCAGATTCTTT R: GCGCGCTCGAGGATTTAC	(CA)13	56	261–437	6-FAM	1	Verne *et al.* (2006)	No
Av9	F*: TCTCGAAGAATTGCCTCACA R: CGATGACTGGGACAATCTCA	(CA)16	56	164–204	HEX	1	Verne *et al.* (2006)	Yes
Av3	F*: TGAGTCTCATTATAGTTTGGATGA R: TCCTCTCTATACCCCATAATTTCA	(CA)4 (CG)2 (CA)1	48	184–234	6-FAM	2	Verne *et al.* (2006)	Yes
AV0018	F*: GAA GAA ATT CAA ACT TCA CCA TC R: CTT TGA ACA GAC TTA CGA ATA ACA TC	CAA	56	97–136	HEX	3	Giraud *et al.* (2013)	Yes
AV0056	F*: TTC AAA GGA GCG TTT GAC CT R: AAC CAC AGC AAC AAC AGC AG	GTT	56	198–224	6-FAM	3	Giraud *et al.* (2013)	Yes
AV0032	F*: TTT CAA CCT TCC TAA CCA AAC C R: TTG TTT TAT ATC CAC GAC CAT CC	TC	56	87–113	NED	3	Giraud *et al.* (2013)	Yes

*The primer labelled with the fluorescent dye. Loci used with the software PrDM have been indicated in the last column.

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

Table 2 Characteristics of all analysed broods and number of fathers.

Wolbachia strain in female	Brood ID	Female size (mm)	Number of genotyped offspring	Minimum number of fathers inferred by GERUD	Most likely number of fathers inferred by COLONY	Observed heterozygosity of mother	Observed heterozygosity of brood
NI	NI1	5.6	18	4	6	0.86	0.64
	NI2	5.5	18	4	5	0.71	0.71
	NI3	6.7	15	3	4	0.71	0.38
	NI4	7.7	15	3	4	0.86	0.71
	NI5	7.2	20	3	4	0.71	0.65
	NI6	7.1	19	4	6	0.57	0.56
	NI7	–	19	3	4	0.71	0.83
	NI8	8.0	12	3	4	0.57	0.63
	Mean	6.83 ± 0.37	17 ± 0.96	3.4 ± 0.18	4.6 ± 0.32	0.71 ± 0.04	0.64 ± 0.12
*w*VulM	M1	7.5	19	3	3	0.57	0.71
	M2	7.7	20	3	6	0.71	0.56
	M3	5.2	20	2	3	0.57	0.60
	M4	6.7	19	3	5	0.71	0.66
	M5	7.3	19	5	7	0.86	0.74
	M6	5.0	19	3	6	0.29	0.56
	M7	5.2	20	2	4	0.71	0.76
	M8	7.2	20	3	5	0.57	0.69
	M9	7.5	20	5	6	0.86	0.73
	M10	4.9	20	1	5	0.43	0.52
	Mean	6.42 ± 0.38	19.6 ± 0.16	3 ± 0.39	5 ± 0.42	0.63 ± 0.06	0.65 ± 0.08
*w*VulC	C1	6.5	20	2	3	0.57	0.69
	C2	7.4	20	2	3	0.86	0.59
	C3	7.2	20	2	3	0.57	0.70
	C4	6.2	20	3	4	0.86	0.72
	C5	7.5	20	2	3	0.57	0.63
	Mean	6.96 ± 0.26	20 ± 0	2.2 ± 0.20	3.2 ± 0.20	0.69 ± 0.07	0.67 ± 0.05

NI, uninfected females. For female NI7, size could not be determined.

correction (Rice, 1989). Then, the allelic frequencies of each microsatellite marker were calculated using the software GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). These allelic frequencies were subsequently used to estimate the probability of detecting multiple paternity and to determine the most likely number of fathers involved in the fecundation of each brood.

Observed heterozygosity and F_{IS} (Weir & Cockerham, 1984) were calculated for the entire population of individuals sampled in the wild using the software GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). To test for departures from Hardy–Weinberg assumptions, we used an exact test (Fisher's method) based on Markov chains with the following parameters: 5000 dememorization steps, 500 batches, 1000 iterations per batch.

Parentage analyses

Probability of detecting multiple paternity (PrDM)

To estimate the probability of detecting multiple paternity (PrDM) using our microsatellite markers data set (i.e. to assess the reliability of our results), different simulations were carried out using the software PrDM (Neff & Pitcher, 2002). These simulations took into account different parameters that might influence the PrDM in broods, such as the number of offspring analysed, the number of fathers, their respective contributions to the fecundation of each brood, and the allelic frequencies of each microsatellite marker in the population. As the software PrDM cannot process data with more than 30 alleles per microsatellite, we excluded the most polymorphic microsatellite marker Av5 from the analysis. PrDM was thus calculated using six microsatellites only. We investigated different conditions as in Jossart *et al.* (2014): (i) two fathers contributed equally (50 : 50%) or unequally (10 : 90%) to the fecundation of broods; (ii) three fathers contributed equally (33 : 33 : 33%) or unequally (10 : 10 : 80%) to the fecundation of broods.

Level of multiple paternity in broods

To estimate the minimum number of fathers involved in the fecundation of each brood, the software GERUD version 2.0 (Jones, 2005) was used. Concomitantly, the most likely number of fathers was inferred using the software COLONY© version 2.0.5.8 (Jones & Wang, 2010). Spearman's correlation tests were then used to test whether the number of genotyped offspring in each brood could influence the assessment of both the minimum and the most likely number of fathers. Older

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

A. vulgare females (i.e. the larger females based on body size, as individuals grow continuously throughout their lifespan without difference between infection statuses (M. Lachat, unpublished data)) are more likely to have encountered and stored sperm from a higher number of males throughout their lives than younger females, potentially resulting in higher levels of multiple paternity. Therefore, this potential bias was tested using Spearman's correlation tests between female body size and the number of fathers (both the minimum and the most likely number of fathers).

Considering that GERUD only provides the minimum number of fathers, which does not reflect the total number of males participating to the production of offspring, the number of fathers inferred with COLONY (i.e. the most likely number of fathers) is a more accurate estimation and was then used in the following analyses.

Effect of female infection status on multiple paternity
To ensure that age did not differ significantly between infection statuses, we compared the size of the females depending on their infection status using a Kruskal–Wallis test. Then, female heterozygosity was calculated with the GENHET function in R (Coulon, 2010) using the PHt index (number of heterozygous loci divided by the total number of genotyped loci), to be compared between infection status. Then, a comparison of the number of fathers between the three female infection statuses was performed with a Kruskal–Wallis test followed by a *post hoc* Dunn test with Holm–Šidák correction.

Contribution of each father to the offspring
To investigate a potential bias in the contribution of fathers to fecundation, the contribution of the different fathers (i.e. the number of offspring) to each brood was inferred using the software COLONY© version 2.0.5.8 (Jones & Wang, 2010). Then, a multinomial test was performed to detect contribution bias within broods for which multiple paternity was detected. Finally, we investigated whether contribution bias in fecundation differed between broods according to female infection status using a Fisher test.

Genetic diversity of broods
To assess the genetic diversity of each brood, the observed heterozygosity was estimated using the software GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). A Spearman's correlation test was performed to detect a correlation between observed heterozygosity and the number of fathers implicated in fecundation for each brood. Then, a Kruskal–Wallis test was performed to compare the observed heterozygosity of broods between the three female infection statuses.

All statistical tests were performed using the software R version 3.1 (R Development Core Team 2013). The function 'xmulti' in the package 'XNomial' was used to perform multinomial tests (Engels, 2014), and the function 'dunn.test' in the package 'dunn.test' was used for *post hoc* Dunn tests after Kruskal–Wallis tests (Dinno, 2016). Means are given ± standard error.

Results

For the entire microsatellite data set, observed heterozygosity was 0.67 and F_{IS} was 0.05 (Fisher's exact test, $P = 0.003$). No null alleles nor linkage disequilibrium were detected for our microsatellites set. Regarding *Wolbachia* infection status among the 23 gravid females, eight were uninfected, 10 were infected with *w*VulM and five were infected with *w*VulC.

Probability of detecting multiple paternity

The probability of detecting multiple paternity was found to increase with the number of offspring included in the simulations. Our confidence in detecting multiple paternity was always higher than 95%, except for an unequal contribution of two fathers (between 61.9% using 10 offspring and 94.1% using 30 offspring) and an unequal contribution of three fathers for 10 offspring (87.3%).

Level of multiple paternity in broods

Multiple paternity was detected in all but one brood based on GERUD (Table 2) (mean minimum number of fathers = 2.96 ± 0.98), and in all broods with COLONY (Table 2) (mean most likely number of fathers = 4.48 ± 1.24). The number of fathers did not seem to be affected by the number of genotyped offspring (Spearman's correlation: $P = 0.99$, $N = 23$ for the minimum number of fathers; $P = 0.89$, $N = 23$ for the most likely number of fathers), nor by female size (Spearman's correlation: $P = 0.15$, $N = 22$ for the minimum number of fathers; $P = 0.68$, $N = 22$ for the most likely number of fathers).

Effect of female *Wolbachia* infection status on multiple paternity

There was no effect of the infection status of females on their body size in our sample (Kruskal–Wallis, KW = 0.53, d.f. = 2, $P = 0.77$), nor on their genetic diversity (Kruskal–Wallis, KW = 1.08, d.f. = 2, $P = 0.58$). The most likely number of fathers differed depending on *Wolbachia* infection status (Fig. 1, Kruskal–Wallis, KW = 7.88, d.f. = 2, $P = 0.02$) with *w*VulC females producing broods with fewer fathers than both uninfected and *w*VulM females (Dunn test, *w*VulC – *w*VulM $P = 0.01$; *w*VulC – uninfected $P = 0.03$; *w*VulM – uninfected $P = 0.32$). To ensure that this result is not due to an error in estimation of the most likely number of fathers by COLONY, we also

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

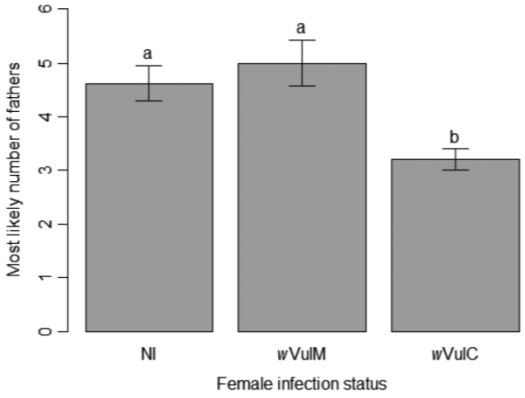

Fig. 1 Most likely number of fathers according to female *Wolbachia* infection status. NI, uninfected females. Bars represent standard errors. Letters above bars represent significant differences of statistical tests (no difference between same letters, significant difference between different letters).

performed the same analysis on the minimum number of fathers. This yielded similar results (Kruskal–Wallis, KW = 6.82, d.f. = 2, $P = 0.03$), with the same observation that *w*VulC females present fewer fathers than uninfected females (Dunn test, $P = 0.01$), even though there was no more significant difference between *w*VulC and *w*VulM females (Dunn test, *w*VulC – *w*VulM $P = 0.09$; *w*VulM – uninfected $P = 0.11$). Thus, the significant difference in the number of fathers between *w*VulC and uninfected females is unlikely to be an artefact due to imprecise estimation of the number of fathers by COLONY.

Contribution of each father to the offspring

According to the number of offspring sired by each father inferred by COLONY, it was observed that fathers contributed unequally to two of eight broods from uninfected females, three of ten broods from *w*VulM-infected females and two of five broods from *w*VulC-infected females (Fig. 2, multinomial test, $P < 0.05$ for unequal contribution). The proportion of broods with unequal contribution of fathers did not differ depending on *Wolbachia* infection status (Fisher's exact test, $P = 1$).

Genetic diversity of broods

The observed heterozygosity of broods was not affected by the number of fathers implicated in fecundation (Spearman's correlation, $P = 0.82$, $N = 23$). Moreover, the observed heterozygosity of broods did not differ significantly depending on the infection status of females (Kruskal–Wallis, KW = 0.09, d.f. = 2, $P = 0.96$).

Discussion

Multiple paternity in *Armadillidium vulgare*

Our study shows that multiple paternity is common in a wild population of *A. vulgare* as all investigated broods had been sired by at least two fathers. These results

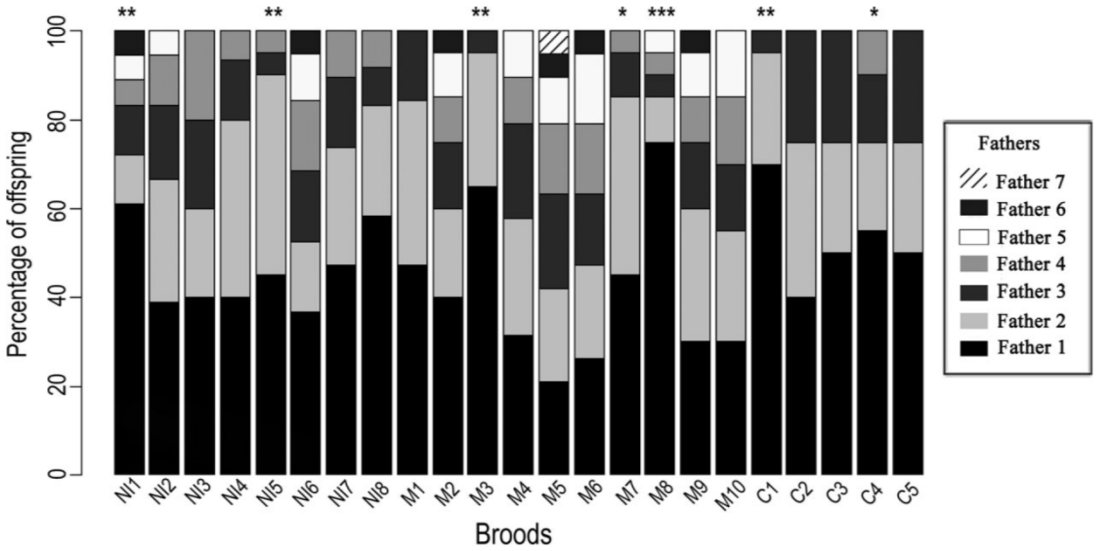

Fig. 2 Contribution of each father to the brood. The letters in brood ID, given under each bar, correspond to female infection status: NI, uninfected; C, *w*VulC-infected; M, *w*VulM-infected. Stars above bars indicate broods with unequal contribution of fathers, with the corresponding levels of significance: *$P < 0.05$; **$P < 0.01$ and ***$P < 0.001$.

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

strengthen previous studies highlighting the occurrence of multiple paternity in this species under laboratory conditions (Moreau *et al.*, 2002; Verne *et al.*, 2007). Therefore, multiple paternity seems to be common in terrestrial isopod species as previously reported in *A. nasatum* (Lueken, 1963) or in *Porcellio scaber* and *Porcellio dilatatus* (Sassaman, 1978). As *A. vulgare* is a gregarious species, the frequent multiple paternities indicate that the prevailing mating strategy is likely promiscuity as males can mate with several females in the same reproductive season (Moreau & Rigaud, 2003). As multiple mating induces costs and no direct benefits have been observed in *A. vulgare* to date, it is likely that multiple paternity offers indirect benefits to females. However, contrary to our expectations, the number of fathers implicated in fecundation does not seem to affect the observed heterozygosity of the broods, suggesting a weak effect of the number of fathers on offspring genetic diversity. This observation can result from a too low sample size to detect such effect. Another explanation could be that multiple paternity is not the only factor able to affect offspring genetic diversity. Indeed, beyond the number of fathers, the intrinsic genetic characteristics of each involved father can drive offspring genetic diversity. Moreover, we cannot reject the possibility that multiple paternity could not increase offspring genetic diversity at all and that other fitness benefits could be brought by multiple mating in our model. As our study did not investigate the role of the multiple paternity on fitness, further experimentations should be done to investigate other potential benefits for females mated with multiple males.

In *A. vulgare*, *Wolbachia* is able to feminize males, distorting the population sex ratio in favour of females. At the population scale, this bias could decrease the number of available males and engender a decrease in the effective population size, likely resulting in an important loss of genetic diversity. However, previous studies have shown that multiple paternity leads to higher effective population size compared with what could be expected in polygynous or monogamous systems (Sugg & Chesser, 1994; Pearse & Anderson, 2009). Thus, combined with a preference of males for uninfected females (Moreau *et al.*, 2001), this promiscuous system could avoid a too rapid collapse of genetic diversity in infected populations of *A. vulgare*.

Impact of *Wolbachia* on multiple paternity in *Armadillidium vulgare*

Our study highlights that females infected with the *w*VulC strain had been fertilized by a lower number of fathers compared with uninfected females and females infected with *w*VulM. This result could be explained by a shorter co-evolutionary history between the host and *w*VulC compared with *w*VulM, as suggested by Cordaux *et al.* (2004). This hypothesis has also been reported by Braquart-Varnier *et al.* (2008) to explain the higher virulence of *w*VulC in *A. vulgare*, resulting in lower haemocyte densities, higher septicaemia in the hemolymph and a reduced lifespan in individuals infected with *w*VulC compared with uninfected individuals or those infected with the *w*VulM strain. In this context, three nonexclusive hypotheses implying both females and males might explain our results. (i) As males prefer to mate with uninfected females compared with infected ones (Moreau *et al.*, 2001), it appears that *Wolbachia* is able to influence the reproductive behaviour of males. The shorter co-evolutionary history between *A. vulgare* and *w*VulC, resulting in a higher virulence of the *w*VulC strain compared with *w*VulM, could have decreased the attractivity of females infected with *w*VulC and thus produce male preference towards females infected with *w*VulM rather than towards females infected with *w*VulC. This would explain the lower number of males contributing to offspring in *w*VulC-infected females compared with uninfected females or *w*VulM-infected females. (ii) It is likely that the higher virulence of the *w*VulC strain leads to a trade-off between the energy invested to cope with the infection and the energy invested in reproduction. Thus, females infected with *w*VulC could spend less time for reproduction and therefore mate with fewer males than uninfected females or females infected with *w*VulM. Moreover, *Wolbachia* infection is also known to alter female mating strategy (Beltran-Bech & Richard, 2014). Along the same lines, Moreau *et al.* (2001) highlighted that *Wolbachia*-infected females of *A. vulgare* show nonadaptive reproductive behaviour leading to a premature ending of the mating sequence with males. Although nothing is known regarding different reproductive behaviours of females infected with *w*VulM or *w*VulC strains, we suggest that the longer co-evolution of the *w*VulM strain with its host could have led to a lower impact on host reproduction, explaining the difference in number of fathers observed between hosts infected with *w*VulM or *w*VulC. (iii) An alternative hypothesis could be that *w*VulC-infected females invest in reproduction as much energy as the other females, thus having a similar overall level of multiple mating. However, they would simultaneously invest more energy in immunity to cope with the more virulent *Wolbachia* strain, leading to a more important energetic expense for these females. Thus, *w*VulC females might not possess the energy necessary to cope with multiple mating, which could lead to the death of the more polyandrous *w*VulC-infected females and their nondetection by our approach.

Unequal contributions of several fathers

Our results show that several broods have an unequal contribution of fathers, independent of *Wolbachia* infection status. Similar differences in paternal contributions have already been observed in different crustacean

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

species such as the crayfish *Procambarus clarkii* (Yue *et al.*, 2010), the lobsters *Munida rugosa* and *Munida sarsi* (Bailie *et al.*, 2011) or the ectoparasite *Dissodactylus primitivus* (Jossart *et al.*, 2014). Two hypotheses could explain these differences: (i) sperm competition and/or cryptic choices of females (both are favoured with multiple mating) as previously suggested by Jossart *et al.* (2014); and (ii) the order of males in mating. For this last hypothesis, the mating order could influence the localization of the sperm from different males in the seminal receptacle. Thus, the father having the highest contribution to the brood could be either the first or the last male to have mated with the female. The importance of sperm localization on fecundation success has been suggested for *A. vulgare* (Moreau *et al.*, 2002) and the crab *Chionoecetes opilio* (Sainte-Marie *et al.*, 2000) and could be tested experimentally under laboratory conditions, for instance by investigating the competitiveness of sequentially stored sperm.

Overall, our study highlights that even if multiple mating is ubiquitous in *A. vulgare*, the number of fathers is dependent on female infection status with *Wolbachia*. This difference is likely the result of evolutionary constraints imposed by the virulence of the symbiont on its host (whatever the underlying mechanism), rather than differential direct or indirect advantages obtained by females of different statuses through multiple mating.

Acknowledgments

We wish to thank Daniel Guyonnet and Magali Maillard for technical assistance, Sébastien Verne for sampling, two anonymous reviewers for their constructive comments and Jessica Dittmer for checking the English in the paper. The funding is partly granted by the following 2015–2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER). This work was supported by the french Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the CNRS. Doctoral studies of Victorien Valette and Sylvine Durand were funded by the Région Nouvelle-Aquitaine, previously Région Poitou-Charentes.

References

Arnqvist, G. & Nilsson, T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim. Behav.* **60**: 145–164.

Bailie, D.A., Hynes, R. & Prodöhl, P.A. 2011. Genetic parentage in the squat lobsters *Munida rugosa* and *M. sarsi* (Crustacea, Anomura, Galatheidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **421**: 173–182.

Bateman, A.J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**: 349–368.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. 2004. *GENETIX 4.05, Population Genetics Software for Windows TM*. Université de Montpellier II, Montpellier.

Beltran-Bech, S. & Richard, F.J. 2014. Impact of infection on mate choice. *Anim. Behav.* **90**: 159–170.

Braquart-Varnier, C., Lachat, M., Herbinière, J., Johnson, M., Caubet, Y., Bouchon, D. *et al.* 2008. *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One* **3**: e3286.

Champion de Crespigny, F.E., Hurst, L.D. & Wedell, N. 2008. Do *Wolbachia*-associated incompatibilities promote polyandry? *Evolution* **62**: 107–122.

Chapman, T., Liddle, L.F., Kalb, J.M., Wolfner, M.F. & Partridge, L. 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory-gland products. *Nature* **373**: 241–244.

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.

Coulon, A. 2010. GENHET: an easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 167–169.

Deaton, R. 2009. Effects of a parasitic nematode on male mate choice in a livebearing fish with a coercive mating system (western mosquitofish, *Gambusia affinis*). *Behav. Process.* **80**: 1–6.

Dinno, A. 2016. Dunn's test of multiple comparisons using rank sums. R package version 132. https://cranr-projectorg/package=dunntest.

Dittmer, J., Beltran-Bech, S., Lesobre, J., Raimond, M., Johnson, M. & Bouchon, D. 2014. Host tissues as microhabitats for *Wolbachia* and quantitative insights into the bacterial community in terrestrial isopods. *Mol. Ecol.* **23**: 2619–2635.

Dittmer, J., Lesobre, J., Moumen, B. & Bouchon, D. 2016. Host origin and tissue-microhabitat shaping the microbiota of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**: fiw063. doi:10.1093/femsec/fiw063fiw063.

Durand, S., Beauché, F., Richard, F.-J. & Beltran-Bech, S. 2015. How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*? *Ethology* **121**: 1122–1130.

Engels, B. 2014. XNomial: exact goodness-of-fit test for multinomial data with fixed probabilities. R package version 101. http://CRANR-projectorg/package=XNomial.

Farahani, H.K., Ashouri, A., Goldansaz, S.H., Farrokhi, S., Ainouche, A. & Baaren, J. 2015. Does *Wolbachia* infection affect decision-making in a parasitic wasp? *Entomol. Exp. Appl.* **155**: 102–116.

Giraud, I., Valette, V., Bech, N., Grandjean, F. & Cordaux, R. 2013. Isolation and characterization of microsatellite loci for the isopod crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in terrestrial isopods. *PLoS One* **8**: e76639.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. Updated from Goudet (1995).

Howard, H.W. 1940. The genetics of *Armadillidium vulgare* latr. *J. Genet.* **40**: 83–108.

Jennions, M.D. & Petrie, M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol. Rev.* **75**: 21–64.

Jones, A.G. 2005. GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol. Ecol. Notes* **5**: 708–711.

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

Jones, O.R. & Wang, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 551–555.

Jossart, Q., Wattier, R.A., Kastally, C., Aron, S., David, B., De Ridder, C. *et al.* 2014. Genetic evidence confirms polygamous mating system in a crustacean parasite with multiple hosts. *PLoS One* **9**: e90680.

Lawniczak, M.K.N., Barnes, A.I., Linklater, J.R., Boone, J.M., Wigby, S. & Chapman, T. 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* **22**: 48–55.

Lueken, W. 1963. Zur Spermienspeicherung Bei Armadillidien (Isopoda Terrestria). *Crustaceana* **5**: 27–34.

Moreau, J. & Rigaud, T. 2000. Operational sex ratio in terrestrial isopods: interaction between potential rate of reproduction and *Wolbachia*-induced sex ratio distortion. *Oikos* **91**: 477–484.

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. Biol. Sci.* **270**: 1535–1540.

Moreau, J., Bertin, A., Caubet, Y. & 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., Seguin, S., Caubet, Y. & Rigaud, T. 2002. Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial crustacean. *Anim. Behav.* **64**: 569–577.

Neff, B. & Pitcher, T. 2002. Assessing the statistical power of genetic analyses to detect multiple mating in fishes. *J. Fish Biol.* **61**: 739–750.

Pearse, D.E. & Anderson, E.C. 2009. Multiple paternity increases effective population size. *Mol. Ecol.* **18**: 3124–3127.

Pomiankowski, A. 1987. The costs of choice in sexual selection. *J. Theor. Biol.* **128**: 195–218.

R Development Core Team. 2013. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://wwwR-projectorg/.

Reynolds, J.D. 1996. Animal breeding systems. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 68–72.

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**: 223–225.

Rowe, L. 1994. The costs of mating and mate choice in water striders. *Anim. Behav.* **48**: 1049–1056.

Sainte-Marie, G., Sainte-Marie, B. & Sévigny, J.-M. 2000. Ejaculate-storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*; Brachyura, Majidae). *Can. J. Zool.* **78**: 1902–1917.

Sassaman, C. 1978. Mating systems in porcellionid isopods: multiple paternity and sperm mixing in *Porcellio scaber* Latr. *Heredity* **41**: 385–397.

Schwenke, R.A., Lazzaro, B.P. & Wolfner, M.F. 2016. Reproduction-immunity trade-offs in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **61**: 239–256.

Sugg, D.W. & Chesser, R.K. 1994. Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics* **137**: 1147–1155.

Suzuki, S. & Ziegler, A. 2005. Structural investigation of the female genitalia and sperm-storage sites in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Arthropod. Struct. Dev.* **34**: 441–454.

Thrall, P.H., Antonovics, J. & Dobson, A.P. 2000. Sexually transmitted diseases in polygynous mating systems: prevalence and impact on reproductive success. *Proc. Biol. Sci.* **267**: 1555–1563.

Valette, V., Bitome Essono, P.Y., Le Clec'h, W., Johnson, M., Bech, N. & Grandjean, F. 2013. Multi-infections of feminizing *Wolbachia* strains in natural populations of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *PLoS One* **8**: e82633.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 535–538.

Verne, S., Puillandre, N., Brunet, G., Gouin, N., Samollow, P.B., Anderson, J.D. *et al.* 2006. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 328–330.

Verne, S., Moreau, J., Caubet, Y., Bouchon, D., Johnson, M. & Grandjean, F. 2007. Male mating success during parturial intermoults in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* revealed by the use of a microsatellite locus. *J. Crust. Biol.* **27**: 217–219.

Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. & Grandjean, F. 2012. Effects of parasitic sex-ratio distorters on host genetic structure in the *Armadillidium vulgare-Wolbachia* association. *J. Evol. Biol.* **25**: 264–276.

Walker, D., Porter, B. & Avise, J. 2002. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Mol. Ecol.* **11**: 2115–2122.

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.

Werren, J.H., Baldo, L. & Clark, M.E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 741–751.

Wittman, T. & Fedorka, K.M. 2015. Male mate choice for unparasitized females in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Behav.* **28**: 37–43.

Yasui, Y. 1998. The genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends Ecol. Evol.* **13**: 246–250.

Yue, G.H. & Chang, A. 2010. Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *Caridina ensifera*. *PLoS One* **5**: e12721.

Yue, G.H., Li, J.L., Wang, C.M., Xia, J.H., Wang, G.L. & Feng, J.B. 2010. High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *Int. J. Biol. Sci.* **6**: 107–115.

Zug, R. & Hammerstein, P. 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One* **7**: e38544.

Data deposited at Dryad: doi: 10.5061/dryad.tj7k5

Received 9 May 2016; revised 31 October 2016; accepted 1 November 2016

© 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY. *J. EVOL. BIOL.* doi: 10.1111/jeb.13009
JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY © 2016 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

III. Pour aller un peu plus loin...

Depuis la publication de cet article, des nouvelles données viennent apporter des informations complémentaires concernant la problématique de paternité multiple chez *A. vulgare*. Nous avons ainsi observé que dans notre jeu de données, la taille des femelles n'est pas corrélée à leur hétérozygotie (corrélation de Spearman, p = 0,24, N = 23). Ce résultat n'implique pas forcément une absence de corrélation biologique entre ces deux mesures puisqu'il s'agit d'individus prélevés en milieu naturel. En effet, chez les isopodes la croissance est extrêmement dépendante des conditions biotiques et abiotiques (Mocquard *et al.*, 1989; Faberi *et al.*, 2011), qui ne sont pas forcément homogènes entre les femelles. De plus les femelles sont potentiellement issues de plusieurs cohortes. Ainsi les différences de tailles pourraient être dues principalement à l'âge et masqueraient un effet de l'hétérozygotie. De plus, nous avons également vérifié que l'hétérozygotie des mères était bien corrélée à celle des portées (corrélation de Spearman, p = 0,03, rho = 0,46, N = 23), confirmant l'héritabilité de l'hétérozygotie telle que prédite par Mitton *et al.* (1993) ou Fromhage *et al.* (2009).

Par ailleurs, l'hétérozygotie n'est pas le seul indice de diversité génétique pouvant être mesuré sur les portées. Nous avons ainsi mesuré la richesse allélique de chaque portée (moyenne sur l'ensemble de la population = 3,56 ± 0,34), mais il semble que cette variable n'est influencée ni par le statut d'infection (Kruskal-Wallis, KW = 0,46, df= 2, p = 0,80, N = 23), ni par le nombre le plus vraisemblable de pères (corrélation de Spearman, r = 0,37, p = 0,10, N = 23). En particulier, l'absence de relation entre nombre de pères et richesse allélique est surprenante, et pourrait être expliquée par (i) une homogénéité génétique entre les différents pères d'une même portée, de sorte qu'ajouter des pères n'ajoute pas de nouveaux allèles dans les portées, ce qui ne correspond pas aux hypothèses formulées au cours de nos travaux, (ii) un seuil de richesse allélique « maximale » atteint très rapidement avec un faible nombre d'appariements, ce qui semble peu probable au vu de la forte richesse allélique de la population entière (richesse allélique globale = 14,7), ou bien (iii) un manque de précision dans notre analyse, par exemple concernant le nombre de pères estimé, qui masquerait des associations significatives. Dans tous les cas, des investigations plus approfondies sont nécessaires pour déterminer l'impact de la paternité multiple sur la diversité génétique des descendants.

Enfin, le même protocole a été appliqué sur une population échantillonnée à Poitiers. Un total de 45 adultes ont été prélevés en avril 2013 et génotypés pour obtenir la fréquence allélique de la population aux mêmes 7 marqueurs microsatellites. Parmi ces individus, 13 étaient des femelles gravides (taille moyenne = 9,07 ± 0,30 mm), toutes infectées par la souche *w*VulP de *Wolbachia* (Verne *et al.*, 2007a). Cette souche a été identifiée comme recombinante entre les souches *w*VulC et *w*VulM, mais à l'heure actuelle, sa virulence et son taux de transmission restent inconnus. L'analyse de ces portées par GERUD a révélé la présence de 2 à 4 pères au minimum (2,9 ± 0,19) au sein des portées, tandis que le nombre le plus vraisemblable de pères obtenu avec COLONY se situe entre 3 et 6 (4,1 ± 0,30). L'hétérozygotie moyenne des portées varie quant à elle entre 0,63 et 0,81 (0,70 ± 0,02). Les populations de Chizé et de Poitiers présentant des conditions écologiques et génétiques différentes, il ne nous est pas possible de déterminer par comparaison comment les différents statuts d'infection par *Wolbachia* (*w*vulP à Poitiers et *w*vulM, *w*vulC et non infectés à Chizé) affectent le niveau de paternité multiple chez cette espèce. Cependant, cette observation confirme que la paternité multiple est un trait répandu chez *A. vulgare*, et qu'il est raisonnable de considérer que ce trait est inhérent à l'espèce.

C.Sex-ratio et diversité génétique : impact sur les stratégies d'appariement et la sélection sexuelle

I. Présentation de l'étude

La paternité multiple est donc systématiquement présente dans la nature avec un nombre de mâles participant à la paternité d'une même portée relativement important (en moyenne 4,48), ce qui de plus souligne une forte capacité copulatoire des femelles. Toutefois, notre étude en population naturelle ne nous permet pas d'accéder aux caractéristiques génétiques des pères, leurs effets potentiels sur le succès de paternité restant inconnus dans ces conditions. Avec un nombre de pères aussi important, nous ignorons si les mâles les plus hétérozygotes présentent toujours un avantage reproductif comme nous avons pu l'observer dans le chapitre I. Etudier le succès de paternité des mâles selon leurs caractéristiques génétiques dans un contexte de paternité multiple élevée est nécessaire pour obtenir une meilleure représentation des processus en milieu naturel.

Dans la nature, nous n'avons pas accès à la temporalité des accouplements. Ces derniers pourraient avoir été réalisés tout au long de la vie des femelles, et la paternité multiple résulterait de l'utilisation des spermatozoïdes accumulés dans la spermathèque, ce qui pourrait là aussi impacter le succès reproducteur des mâles (Moreau *et al.*, 2002). Sous nos latitudes, les femelles ont en effet jusqu'à trois évènements de reproduction dans l'année (Vandel, 1962) et une longévité maximale de trois ans (comme observé en laboratoire, et estimé dans la nature (Sutton *et al.*, 1984)), ce qui leur confère de multiples occasions de s'accoupler. Cela n'exclut pas pour autant la présence d'accouplements multiples au sein d'un même évènement de reproduction. Nous avons pu observer ce phénomène en laboratoire dans la moitié des cas lorsque nous avons présenté deux mâles à une seule femelle (Durand *et al.*, 2017). Cependant, les conditions de sex-ratio fortement biaisé en faveur des mâles (i.e. deux mâles pour une femelle = 67% de mâles) que nous avons utilisées pourraient favoriser la survenue d'accouplements multiples. L'occurrence d'appariements multiples dans une seule intermue pourrait donc ne pas être représentative des stratégies d'appariement en milieu naturel, où les sex-ratios seraient plus souvent équilibrés ou biaisés en faveur des femelles (Moreau & Rigaud, 2000).

Des conditions de sex-ratio moins biaisées envers les mâles pourraient donc être moins favorables à l'apparition d'accouplements multiples.

Le sex-ratio est un paramètre central en génétique des populations. En effet, il est directement lié à la taille efficace des populations. Ce dernier paramètre a été introduit par Wright (1931) suite au constat que tous les individus ne sont pas reproducteurs au sein d'une population naturelle, par exemple à cause de la présence de générations chevauchantes où les cohortes plus jeunes ne sont pas matures sexuellement. La taille efficace représente donc la taille d'une population idéale au sein de laquelle le taux de perte de diversité génétique causé par la dérive génétique a lieu au même rythme que pour la population considérée. Or la taille efficace est affectée non seulement par l'effectif de recensement de la population, mais également par la variance dans le succès de reproduction et les biais de sex-ratio (Wright, 1938; Frankham, 1995). Le sex-ratio a donc un impact sur le maintien de la diversité génétique dans les populations : en effet, plus le sex-ratio est biaisé envers l'un des sexes, plus la variance dans le succès de reproduction augmente. Cela cause une diminution de la taille efficace, et ainsi augmente le taux de perte de diversité génétique par dérive génétique. D'autre part, le sex-ratio peut conditionner l'intensité et la direction de la sélection sexuelle, via une modulation du nombre de partenaires sexuels disponibles pour chaque sexe (Kvarnemo & Ahnesjo, 1996). Des expériences de manipulation du sex-ratio ont notamment illustré ce phénomène en conduisant à une inversion des rôles entre les sexes dans la compétition intra et intersexuelle (Jirotkul, 1999). Les mécanismes de sélection sexuelle en relation avec les caractéristiques génétiques que nous avons pu observer précédemment pourraient alors être dépendants du sex-ratio dans la population. Il est à noter que le sex-ratio brut n'est pas forcément le paramètre le plus précis pour étudier le sens de la compétition sexuelle. D'après Emlen & Oring (1977), il faudrait considérer seulement les individus de chaque sexe disponibles pour la reproduction à un temps donné, c'est-à-dire en excluant les mâles et les femelles ne prenant aucunement part à la compétition pour la reproduction. Le sex-ratio opérationnel a ainsi été défini comme le ratio d'individus de chaque sexe aptes à la reproduction à un instant donné, et sa mesure permettrait d'obtenir une meilleure résolution que le sex-ratio brut (Kvarnemo & Ahnesjo, 1996).

Dans l'étude suivante, nous avons cherché à savoir quel était le taux de paternité multiple dans un seul évènement de reproduction, et si l'effet des caractéristiques génétiques sur le succès de paternité observé dans ces conditions rejoignait nos observations précédentes. Pour ce faire, nous avons utilisé des conditions variables de sex-ratio (20, 50, 80 et 90% de femelles) sur des populations composées de 10 individus (**Figure 9**). Dans ces conditions expérimentales, nous n'avons pas accès au sex-ratio opérationnel. Ce dernier est en effet extrêmement difficile à manipuler chez le cloporte puisqu'il nécessiterait d'obtenir suffisamment de femelles réceptives (en plaques blanches parturielles, période durant environ deux semaines (Steel, 1982)) parfaitement synchronisées à la même étape de leur cycle de mue, tout en faisant en sorte de placer ensemble des individus non apparentés. Toutefois, la présence de mâles stimule l'ovogénèse (Lefebvre & Caubet, 1999), ce qui maximise nos chances d'obtenir un grand nombre de femelles réceptives en même temps dans cette expérience. Les mâles ont été retirés des populations trois semaines après le début de l'expérience, soit une fois que toutes les

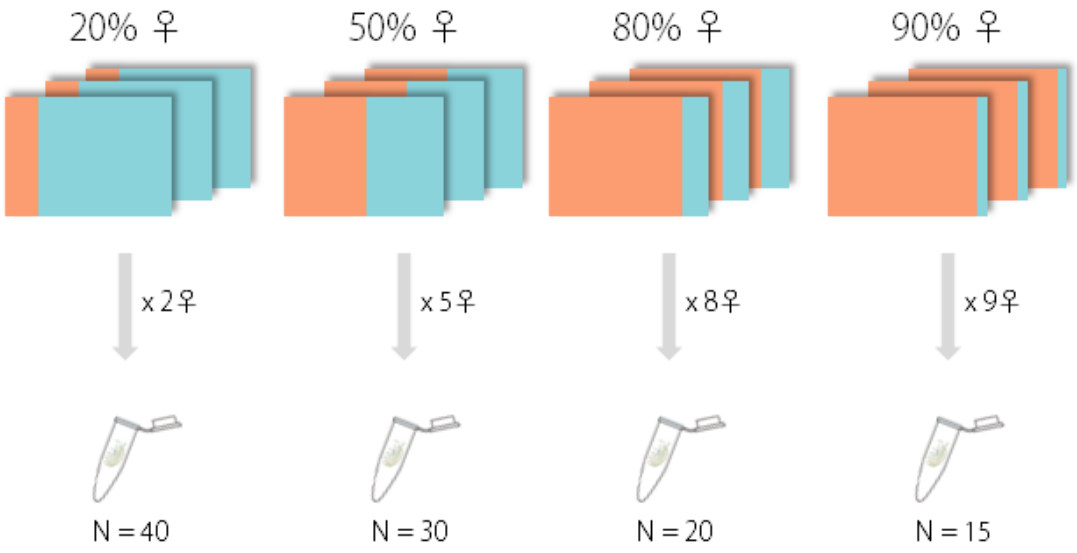

Figure 9 Représentation schématique du protocole expérimental. Nous avons réalisé trois réplicas pour chacune des différentes conditions de sex-ratio, à savoir biaisé en faveur des mâles, équilibré ou biaisé en faveur des femelles. Une dernière condition avec 90% de femelles (un seul mâle) nous a servi de témoin positif pour vérifier les capacités d'insémination des mâles dans nos conditions expérimentales. Les portées de chaque femelle ont été récoltées individuellement et une partie des descendants a été utilisée pour réaliser des analyses de paternités. Nous avons augmenté le nombre de descendants analysés en fonction de la proportion de mâles dans la population afin de mieux refléter les patrons de paternité.

femelles d'un même réplica avaient effectué leur mue parturielle. Après avoir isolé les femelles individuellement, nous avons procédé à des analyses de paternité sur leur descendance.

Nous avons ainsi pu observer jusqu'à cinq pères par portée, soulignant la forte capacité copulatoire des femelles malgré la présence d'un comportement réfractaire (Moreau *et al.*, 2002). Comme on pouvait s'y attendre, le nombre de pères est plus important en condition de sex-ratio biaisé en faveur des mâles, et est positivement corrélé à la richesse allélique au sein des portées. En revanche, un grand nombre de père n'augmente pas l'hétérozygotie ni la taille de la portée. Aucun effet de la similarité génétique n'a été observé sur le succès de paternité. En revanche, si l'hétérozygotie des mâles ne leur confère pas d'avantage en termes de proportion de descendants engendrés au sein de chaque portée, elle leur permet d'engendrer plus de descendants au sein du croisement entier, probablement en leur permettant d'inséminer plus de femelles. Les mâles les plus hétérozygotes pourraient donc plus contribuer aux générations suivantes. Or, l'hétérozygotie des pères est corrélée à celle de leurs descendants : le meilleur succès des mâles hétérozygotes serait un paramètre important dans le maintien de la diversité génétique des populations sur le long terme. Etant donné que la probabilité pour chaque mâle d'inséminer au moins d'une femelle a tendance a être moins élevée quand le sex-ratio est biaisé en faveur des mâles, les biais de sex-ratio pourraient impacter les processus de sélection sexuelle basés sur les caractéristiques génétiques des mâles que nous avons observés et donc l'évolution de la diversité génétique dans les populations naturelles.

II. Article en préparation : "Sex-ratio variations and sexual selection for genetic characteristics in a terrestrial isopod"

Durand Sylvine, Braquart-Varnier Christine, Beltran-Bech Sophie

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073 POITIERS, France

Telephone: +33 5 49 36 64 08
Fax: +33 5 49 45 40 15
Email: durand.sylvine@gmail.com

Sexual selection can be affected by numerous factors. Among them, sex-ratio variations are widespread in the wild and are predicted to act on direction and intensity of sexual selection. However, few studies ever investigated whether sexual selection acting upon individual genetic characteristics can be affected by sex-ratio. Here, we investigated this question using the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* in which sex-ratio can vary dramatically in the wild. We placed animals under four different sex-ratio conditions (one male-biased, one balanced, one female-biased and a final female biased with a single male as a control for male mating capacities), and collected females after matings. We then performed paternity tests on offspring using 11 microsatellite markers, which we used to compute genetic indexes of heterozygosity and similarity to sexual partners. We observed that both a high sex-ratio and a high male heterozygosity tended to increase the proportion of inseminated females, and these two parameters also increase the proportion of offspring sired by males among all broods produced in their replicate of sex-ratio. The number of fathers within the broods increased with bias in males, and positively impacted brood allelic richness while having no effect on brood size and mean heterozygosity. As female-biased conditions decrease male-male competition, we can expect a decreased selection for more heterozygous males under such circumstances, which can have implications on population genetic diversity.

Keywords: multiple paternity, crustaceans, genetic diversity, sexual selection, sex ratio bias

Sex-ratio is a key component in evolution. Darwin (1871) already wondered why populations were mostly constituted of an equal number of males and females, but it was Fisher (1930) who theorised this phenomenon. However, sex-ratio biases towards males (Poulin & FitzGerald, 1989; Beltran & Boissier, 2010) or females (Wade *et al.*, 2003) are quite common in the wild (Hamilton, 1967), and result from numerous factors such as resource availability (Charnov *et al.*, 1981), local mate competition (Macke *et al.*, 2011) or the presence of sex-ratio distorters (Werren *et al.*, 2008). Variations in sex-ratio can have tremendous implications, because the number of available sexual partners of each sex is determinant for the intensity and/or direction of sexual selection (Kvarnemo & Ahnesjo, 1996). Indeed, the sex in excess should be more likely to experience intrasexual competition for the access to the other sex, and the sex in deficit is expected to perform mate choice (Emlen & Oring, 1977; Kokko & Jennions, 2008; Liker *et al.*, 2013). This has been observed by experimentally modifying sex-ratios. For example, under male-biased sex-ratio, males compete more for the access to females, and female preference for male traits increases (Jirotkul, 1999; Aronsen *et al.*, 2013), whereas under female-biased sex-ratio, female-female competition and male choosiness for female traits can be observed (Bonduriansky, 2001).

Among the plentiful traits that can shape intra- and intersexual selection, genetic characteristics have recently received an extensive attention due to the increasing use of molecular tools in behavioural ecology. Heterozygosity traduces the variability of alleles possessed by an individual, and has been the subject of numerous studies highlighting correlations between this inherent characteristic and various fitness traits across many taxa (Chapman *et al.*, 2009; Szulkin *et al.*, 2010). This genetic parameter can be sexually selected for (Kempenaers, 2007), as high heterozygosity values have been associated with increased competitive abilities (Hoglund *et al.*, 2002; Gage *et al.*, 2006) and increased success in intersexual selection (Fromhage *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 2010; Laloi *et al.*, 2011). Another crucial genetic parameter in sexual selection is genetic similarity, based upon allele sharing between sexual partners. Literature is abundant in both theoretical (Zeh & Zeh, 1996; Tregenza & Wedell, 2000) and experimental work (Landry *et al.*, 2001; Tregenza & Wedell, 2002; Beltran *et al.*, 2008; Fitzpatrick & Evans, 2014) about the genetic compatibility theory, in which individuals chose

genetically dissimilar partners to increase offspring heterozygosity. Such mechanisms are expected to increase the global genetic diversity of populations. However, to our knowledge, no study has ever investigated whether biases in sex-ratio could affect the intensity of sexual selection acting on those genetic characteristics and hence the impact of sex-ratio on population diversity through sexual selection.

The common woodlouse *Armadillidium vulgare* is a relevant model to investigate such problematic. Indeed, sex-ratio variations are widespread in natural populations of this terrestrial isopod due to the presence of diverse feminising and masculinising factors (Cordaux *et al.*, 2011). The most studied of them are certainly the facultative endosymbionts *Wolbachia* (Bouchon *et al.*, 1998). These alpha proteobacteria enhance their mother-to-offspring transmission by turning genetic males into phenotypic females, leading to female-biased sex-ratios. Similarly, the nuclear f element (Leclercq *et al.*, 2016) and M gene (Rigaud & Juchault, 1993) are respectively feminising and masculinising factors, both susceptible to modify population sex-ratios. As a result of all those factors, sex-ratio varies widely in natural populations of *A. vulgare* (from 30 to 85% of females (Verne *et al.*, 2012)).

In *A. vulgare*, genetic characteristics are implicated in sexual selection. Males offered a choice between two females spent more time near the most dissimilar one when both females differ enough in their similarity to the male (Durand *et al.*, 2015). When a female is housed with two males, a low male-female similarity predicts a higher paternity success if only one male fathers offspring, but a high male heterozygosity always predicts a higher success whatever the number of fathers in the brood (Durand *et al.*, 2017). Indeed, *A. vulgare* is a promiscuous species, with broods which can result from up to seven fathers in the wild (Valette *et al.*, 2017). To this day, we ignore the timing in which multiple matings take place, because females possess a seminal receptacle allowing them to use stored sperm in subsequent broods for several reproductive events (Howard, 1940). This structure could represent an important site for spermatic competition and female cryptic choice (Eberhard, 1996), two phenomena on which sex-ratio could have consequences by modifying the intensity of sexual selection.

The present study aims to characterise the impact of sex-ratio on the intensity and direction of sexual selection regarding genetic characteristics in *A. vulgare*. To do so, we experimentally measured the number of sexual partners and offspring for each sex in relation to individual genetic characteristics under different sex-ratio conditions. We estimated male success as the number of inseminated females and the proportion of sired offspring in each brood, and also focused on female strategies and their consequences on offspring number and genetic diversity.

Material and methods

Animals

All *A. vulgare* individuals used in this study belong to a lineage descending from animals collected in 1982 in Helsingör, Denmark. Since collection they have then been reared under laboratory conditions in plastic boxes filled with humid loam and fed with dried linden leaves and carrot slices *ad libitum*, under the natural photoperiod of Poitiers, France (46° 35' N, 0° 20' E) at 20°C. To ensure lineage maintenance, crosses are performed each year by isolating one-year-old virgin reproductive couples, being cautious to avoid inbreeding. After mating, females undergo a parturial moult, characterized by the appearance of a *marsupium* on the sternites. This ventral pouch receives the fecundated eggs laid by the female. Eggs are incubated during one month, at the end of which fully developed offspring leave the *marsupium* (Surbida & Wright, 2001). The offspring are then collected and reared together in the same box until they reach three months, age at which their sexual organs are developed enough for an observer to determine the sex of the individual. Males and females are then placed in separate boxes to ensure their virginity.

Experimental setup

We used a total of 120 individuals in our experiment (48 males and 72 females). All individuals were one-year-old, virgin, sexually mature animals, and a leg was collected from each individual using thin tweezers before the experiment for subsequent genetic analyses. Animals were gathered into twelve

groups of ten animals (hereafter named "crosses"), distributed into four sex-ratio conditions with three replicates each. One condition was male-biased (20% of females, coded 20%$_F$), one was balanced (50% of females, 50%$_F$), and another was female-biased (80% of females, 80%$_F$). A fourth female-biased condition with 90% of females (90%$_F$) was used as a control, to determine how many females a single male could inseminate in the absence of male-male competition and within the duration of the experiment. To avoid close inbreeding avoidance or kin selection mechanisms, we selected individuals so as to not place siblings or cousins in the same cross. Each cross was housed in 35.5 x 23.5cm plastic boxes with humid loam and fed with dried linden leaves and carrot slices, and placed under a stimulating photoperiod (18L: 6D) to enhance reproduction.

Once a week after the beginning of the experiment, boxes were searched for all animals to monitor death and female moulting status. After three weeks of experiment, all females had undergone their parturial moult, so males were removed to avoid disturbing females during incubation. Three weeks after the first parturial moult within a cross (i.e. five or six weeks after the beginning of the experiment), all females were individualised in small plastic boxes containing humid paper and a dried linden leaf. Since then, females were controlled daily and all maternal siblings were collected and counted on their day of birth or the following day. As we can expect to have more fathers in crosses under male-biased conditions, a higher number of analysed offspring is needed to increase our power to detect all fathers. The number of offspring collected for molecular analyses thus depended on sex-ratio: 40 offspring were collected for 20%$_F$, 30 offspring for 50%$_F$ and 20 offspring for 80%$_F$. For females in 90%$_F$ crosses, all offspring were counted but we did not use them for paternity analyses because there was only one possible father.

Genotyping

As a first step, genotyping was realised only on adults and offspring from crosses with 20, 50 and 80% females (1099 individuals) because paternity analyses were not necessary on 90%$_F$ crosses which contained a single male. DNA was extracted from adult legs or whole offspring as follows: samples were placed in 120 µL of sterile water, and legs were crushed with tweezers to break the cuticle. Five

µL of proteinase K (20mg/mL) and 20 µL of 5% Chelex solution (Sigma-Aldrich) were added to the sample, which was incubated for 3 h at 56°C, then for 10 min at 95°C.

PCR were performed on 11 microsatellite markers (Av1, Av2, Av3, Av4, Av5, Av6, Av9 (Verne *et al.*, 2006); Av18, Av32 Av56, Av63 (Giraud *et al.*, 2013)) gathered in three multiplexes (Durand *et al.*, 2015). Amplification took place in the same conditions as in Durand *et al.* (2015) with fluorescein marked forward primers. PCR products separation was performed by GenoScreen (Lille, France) on an automated sequencer. Resulting electropherograms were analysed with the software GeneMapper version 3.7 (Applied Biosystems) to score microsatellite alleles.

Paternity analyses

We used the software Colony version 2.0.6.3 (Jones & Wang, 2010) to identify the parents of each brood. This software allows for parentage reconstruction from offspring and parental genotypes using likelihood methods. A genotyping error rate of 0.01 was used for all loci. We performed analyses on one brood at a time, and only included offspring for which at least three loci were genotyped. Genotypes of all offspring in a brood were entered into the software, as well as genotypes of all candidate mothers and fathers for the considered brood (i.e. all adults within the cross), and we specified that all offspring shared the same mother. Colony output provides parent-offspring pairs with a given probability. In all cases, a single mother was identified for the whole brood with a probability of 1. However, offspring were sometimes attributed several possible fathers, or a father with a low probability. We decided to restrain the following analyses to offspring whose father was identified with a probability higher than 0.75, as in other studies (Coetzer *et al.*, 2017).

Genetic characteristics

Male-female genetic similarity was calculated for all potential parental pairs within each cross. We used the software SPAGeDi version 1.4 (Hardy & Vekemans, 2002) to calculate the *r* coefficient of Wang (Wang, 2002), ranging from -1 for completely dissimilar pairs to 1 for completely similar pairs. Individual genetic diversity was calculated for all adults and offspring using the function GenHet (Coulon, 2010) in R. As some individuals could not be typed on all loci, we computed the multilocus

standardised heterozygosity H_s (Coltman *et al.*, 1999) which divides the proportion of typed heterozygous loci by the mean observed heterozygosity for typed loci. It takes a value of 0 for completely homozygous individuals, and reaches a maximum for the most heterozygous individual of the dataset (maximum proportion of typed loci divided by mean observed heterozygosity for typed loci). For simplicity, we use the term "heterozygosity" for multilocus standardised heterozygosity in this manuscript. For each brood, allelic richness was computed using the software FSTAT (Goudet, 1995).

The mean within-cross male heterozygosity was calculated for each cross. We also calculated the mean genetic similarity between each female and all males in her cross. Similarly, we also calculated for each brood the mean heterozygosity of fathers, as well as the mean genetic similarity between the mother and the fathers.

Statistical analyses

Two males from different crosses died within the first week of experiment. Their death was attested by the observation of remains for both individuals, confirming that we did not just simply fail to detect a living animal when searching loam. In each of those two crosses, all males except one mated with at least one female. It is reasonable to consider that the two males died before having any opportunity to mate and that sex-ratio was modified at the beginning of the experiment. Thereby, male-male competition and female choice in those two crosses might differ from others with the same initial sex-ratio conditions, so we had to adapt our analyses to the death of those two males. (i) One of them belonged to a cross with $50\%_F$. We still considered the sex-ratio to be $50\%_F$, because creating a new category with 55.6% females would not make sense with a single replicate. (ii) The second male belonged to a cross with $80\%_F$, so only one male was left to mate with females. This cross was thus treated as a $90\%_F$ cross. We constructed Linear Models (LMs), Linear Mixed Models (LMMs) or Generalised Linear Mixed Models (GLMMs) to analyse our data. Correlations between all explanatory variables were tested to avoid including correlated explanatory variables in a single model. Correlation tables are provided in Supplementary Material S1. No interactions between independent variables

were included in models, because sample size, which was comprised between 31 and 42 (males or females) was too low to detect interactions (Hernandez *et al.*, 2006).

We used LMs to investigate the presence of unexpected correlations between adult genetic characteristics. We searched for a correlation between male and female heterozygosity, and tested whether the sex-ratio influenced male heterozygosity, female heterozygosity or pairwise male-female genetic similarity. Pairwise male-female genetic similarity was tested for the effect of male and female heterozygosity with a LMM including male and female identity as a random effect, because the frequency of the alleles possessed by a given individual can affect genetic similarity, so that individual identity should be accounted for.

Three explanatory variables (male heterozygosity, mean male genetic similarity to all females within his cross and sex-ratio) were included together in a model to investigate male insemination success at two scales. (i) The probability to inseminate at least one female in the cross (0 for no female inseminated, 1 for one or more females inseminated) was modelled using a GLMM with a logit link and a variance given by a binomial distribution and cross identity as a random effect. However, insemination success always took the value of 1 when the sex-ratio was $80\%_F$, leading to issues of quasi-complete separation. Hence the analysis was run only on $20\%_F$ and $50\%_F$ crosses. (ii) The proportion of inseminated females was tested with the number of inseminated females as response variable in a GLMM with a log link and a variance given by a Poisson distribution, with log of the number of females which gave birth within the cross as an offset, and cross identity as a random effect.

The investigation of male success in offspring production used same three explanatory variables in another GLMM to explain the proportion of offspring fathered by a male relative to the total number of offspring produced in his cross. To do so, the total number of offspring fathered by a male was modelled with a log link and a variance given by a negative binomial distribution to account for overdispersion, including the total number of offspring for which a father was determined in the cross as an offset, and cross identity as a random effect. Similarly, the number of offspring fathered by a

male within each brood was modelled as a function of male heterozygosity and pairwise male-female similarity in a GLMM with the same log link and negative binomial distribution, with the total number of offspring for which a father was determined in the considered brood as an offset, and male identity nested within cross identity as a random effect. We constructed a nearly identical model with this time sex-ratio as the explanatory variable, not included into the previous model because of correlation issues between sex-ratio and male heterozygosity (see Supplementary Material S1).

Finally, response variables regarding female strategies were tested several times with different sets of explanatory variables because some of them were correlated and could not be included together (Supplementary material S1). As such, the number of fathers in each brood was modelled with a GLMM with a log link and a Poisson distribution with cross identity as a random effect, with either (i) female heterozygosity, mean male heterozygosity within the cross and mean female similarity to males within the cross, or (ii) sex-ratio as explanatory variable(s). To investigate which parameters influenced the proportion (and not the number) of males a female reproduced with, the two last models were performed a second time including the number of males within the cross as an offset. This offset consisted only of males which produced offspring, because the non reproducing males could be sterile and including them could bias the analysis. Then, brood size was modelled in GLMMs with a log link and a negative binomial distribution with cross identity as a random effect as a function of (i) female heterozygosity, mean fathers heterozygosity and mean female similarity to fathers, (ii) number of fathers and (iii) sex-ratio. Mean heterozygosity of offspring with identified father for each brood, as well as allelic richness for each brood, were modelled with LMs with the same three sets of explanatory variables than brood size.

We used backward elimination to simplify statistical models constructed with all explanatory variables (full models): terms with an associated $p>0.1$ were removed one by one, starting by the one with the highest p. The model was then fitted again until only terms with $p<0.1$ were retained (minimal models). In the results section, statistics from minimal models are provided for terms with $p<0.1$, and statistics for full models are provided for terms with $p>0.1$. Both models are provided in

Supplementary Material S2. Significance of variables is tested using type II Wald χ^2-tests for GLMM or F-tests for LM and LMM.

The software R v.3.4.1 (R Development Core Team, 2013) was used to perform statistical analyses. LM were realised with the function "lm" in the package "stats" (R Development Core Team, 2013), LMM and GLMM were realised with the functions "lmer" and "glmer" from the package "lme4" (Bates *et al.*, 2014), excepted for models with offspring number as a response variable, which were realised with the function "glmer.nb" of the same package. Type II Wald χ^2-tests and F-tests were performed with "Anova" from the "car" package (Fox *et al.*, 2017), and p-values for GLMM and LMM were obtained with the function "mixed" from the package "afex" (Singmann *et al.*, 2016). Pairwise comparisons when the effect of the sex-ratio was significant were performed with the function "glht" from the package "multcomp" (Hothorn *et al.*, 2008). Significance threshold was set to 0.05 and means are given ± standard error.

Results

1) Crosses description

Female heterozygosity ranged from 0.33 to 1.49 (mean = 0.99 ± 0.04), and male heterozygosity ranged from 0.33 to 1.65 (mean = 1.00 ± 0.04). Pairwise genetic similarity between potential reproductive partners was comprised between -0.61 and 0.65 (mean = 0.001 ± 0.02). Out of the 72 females used, 6 died without having offspring (2 in $80\%_F$ and 4 in $90\%_F$ crosses), 1 did not undergo any parturial moult (in $80\%_F$) and 2 aborted before birth (in $80\%_F$ and $90\%_F$). Four females produced a low number of offspring (6 offspring for 2 females in $50\%_F$ and 1 female in $80\%_F$; 19 offspring for 1 female in $90\%_F$) which is way below the usual brood size (see section 3b.), so we decided not to include them in the analyses. The remaining 59 females produced a brood (6 females in $20\%_F$, 13 in $50\%_F$, 12 in $80\%_F$ and 28 in $90\%_F$), from which a total of 1010 offspring were genotyped, among which 810 were assigned a father with a probability higher than 0.75 by Colony.

Unless otherwise stated, the following analyses are performed only on crosses with 20, 50 and 80%$_F$ females. Within those crosses, male-female genetic similarity was not influenced by male heterozygosity (χ^2 = 0.08, df = 1, n = 151 male-female pairs, p = 0.78) nor by female heterozygosity (χ^2 = 1.49, df = 1, n = 151 male-female pairs, p = 0.22). Male heterozygosity was not correlated to female heterozygosity within each potential reproductive pair (F(1, 149) = 0.05, n= 151 male-female pairs, p = 0.82). These three sex-ratio conditions did not differ in male heterozygosity (F(2,42) = 1.45, n = 45 males, p = 0.25, table 1), female heterozygosity (F(2,35) = 0.77, n = 38 females, p = 0.47, table 1) nor male-female genetic similarity (F(2,149) = 0.36, n = 151 male-female pairs, p = 0.70, table 1).

1) Male success

a. Insemination success

Probability to inseminate at least one female

Out of 42 males alive one week after the start of the experiment, 32 reproduced with at least one female. All males in crosses with 80%$_F$ inseminated at least one female (n = 4 males). In the remaining crosses (20 and 50%$_F$), the probability to inseminate at least one female was not affected by male heterozygosity (χ^2 = 2.55, df = 1, n = 38 males, p = 0.11) nor male mean genetic similarity to all females in his cross (χ^2 = 0.09, df = 1, n= 38 males, p = 0.76), but there was a trend for an effect of the sex-ratio (χ^2 = 3.31, df = 1, n = 38 males, p = 0.069) with males in 50%$_F$ seeming more likely to reproduce with at least one female than males in 20%$_F$ (β = 2.06 ± 1.13).

Proportion of inseminated females within the cross

Overall, 0.83 ± 0.16 females were inseminated per male in 20%$_F$, 2.5 ± 0.33 females in 50%$_F$ crosses and 4.5 ± 0.5 females in 80%$_F$ crosses. For each male, the proportion of inseminated females did not depend on mean male genetic similarity to all females in his cross (χ^2 = 0.45, df = 1, n= 38 males, p = 0.50), but tended to increase with male heterozygosity (χ^2 = 3.67, df = 1, n= 38 males, p = 0.055, β =

Table 1 Summary of male and female heterozygosity, pairwise male-female genetic similarity and response variables for each sex-ratio condition. Mean ± se are presented.

Sex-ratio (% females)	**Male heterozygosity**	**Female heterozygosity**	**Pairwise male-female relatedness**	**Probability to inseminate at least one female**	**Male % of inseminated females**	**Male % of offspring sired within each brood**	**Male % of offspring sired within the cross**	**Number of fathers in broods**	**Brood % of fathers relative to number of males**	**Brood size**	**Mean offspring heterozygosity**
20%	1.01 ± 0.07	1.07 ± 0.10	0.03 ± 0.04	0.63 ± 0.10	41.67 ± 7.77	30.00 ± 3.72	20.00 ± 3.85	3.33 ± 0.49	69.05 ± 10.54	158.33 ± 14.63	1.06 ± 0.06
50%	1.05 ± 0.06	0.90 ± 0.08	-0.01 ± 0.03	0.93 ± 0.07	58.21 ± 7.40	37.14 ± 3.00	23.08 ± 3.28	2.69 ± 0.21	62.31 ± 4.03	124.69 ± 9.88	0.96 ± 0.03
80%	0.82 ± 0.07	1.00 ± 0.07	-0.02 ± 0.04	1.00 ± 0.00	75.00 ± 8.33	76.00 ± 6.88	50.00 ± 5.01	1.5 ± 0.15	75.00 ± 7.54	123.67 ± 13.42	0.93 ± 0.06
90%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	133.00 ± 9.32	-
mean	*1.00 ± 0.04*	*0.98 ± 0.05*	*0.00 ± 0.02*	*0.76 ± 0.07*	*50.36 ± 5.35*	*47.50 ± 3.43*	*25.00 ± 2.84*	*2.35 ± 0.19*	*68.53 ± 3.93*	*131.85 ± 5.84*	*0.97 ± 0.03*

0.93 ± 0.49) and to be affected by the sex-ratio (χ^2 = 5.47, df = 2, n= 38 males, p = 0.065, table 1) with males in 80% females crosses inseminating proportionately more females than in 20% crosses (β =0.83± 0.35, p = 0.05). No difference in the proportion of inseminated females was observed between 20 and 50%$_F$ (β = 0.34 ± 0.28, p = 0.45) nor between 50 and 80%$_F$ (β = 0.49 ± 0.31, p = 0.26).

b. Offspring production

Male success at the female scale (within each brood)

The proportion of offspring each father sired in each brood was not affected by pairwise male-female genetic similarity (χ^2 = 0.32, df = 1, n = 80 full-siblings groups, p = 0.57) nor by male heterozygosity (χ^2 = 0.14, df = 1, n = 80 broods, p = 0.71). However, it depended on the sex-ratio as expected (χ^2 = 41.31, df = 2, n = 80 broods, p < 0.001, figure 1). Indeed, fathers in 80%$_F$ sired a higher proportion of offspring than fathers in 20%$_F$ (β = 0.93± 0.16, p < 0.001) and 50%$_F$ (β = 0.71 ± 0.14, exp(β) = 2.03, p < 0.001), but there was no difference between 20 and 50%$_F$ (β = 0.21 ± 0.15, p = 0.33).

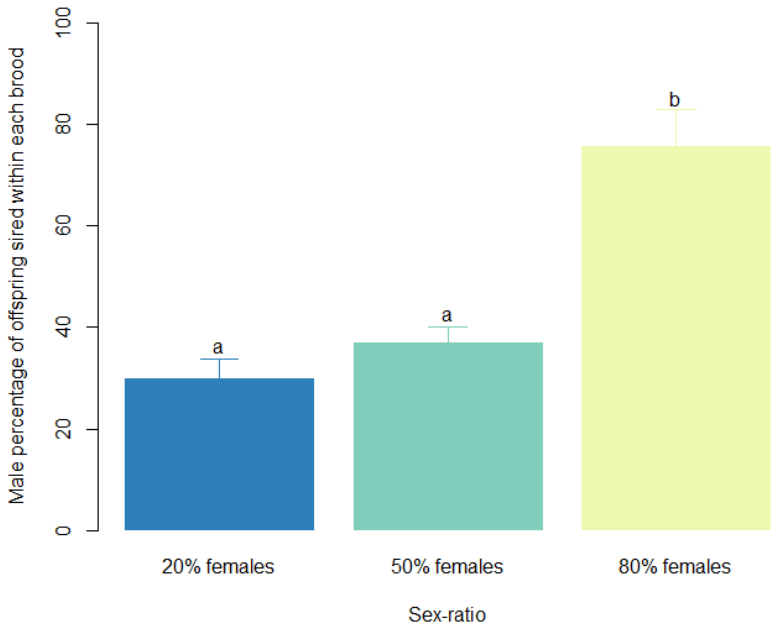

Figure 1 The proportion of offspring sired by male in each brood is influenced by the sex-ratio.

Male success at the cross scale (across all broods in the cross)

For males which inseminated at least one female, the proportion of sired offspring within the whole cross was not affected by mean male genetic similarity to all females in his cross ($\chi^2 = 0.39$, df = 1, n = 32 males, p= 0.53), but increased with male heterozygosity ($\chi^2 = 4.96$, df = 1, n = 32 males, p = 0.026, $\beta = 0.86 \pm 0.39$), and was affected by the sex-ratio ($\chi^2 = 13.64$, df = 2, n = 32 males, p = 0.001, table 1). Males in $80\%_F$ sired a higher proportion of offspring than fathers in $20\%_F$ ($\beta = 1.25 \pm 0.34$, $p < 0.001$) and $50\%_F$ ($\beta = 1.00 \pm 0.32$, p = 0.006), but there was no difference between 20 and $50\%_F$ ($\beta = 0.25 \pm 0.22$, p = 0.48).

2) Female strategies

a. Multiple mating

Number of partners

Females which were presented to more than one male produced offspring with 1 to 5 males (mean = 2.35 ± 0.19). The total number of mates (irrespective of the number of available males) was not affected by female heterozygosity ($\chi^2 = 0.05$, df = 1, n = 31 females, p = 0.82) nor by mean female genetic similarity to males in the cross ($\chi^2 = 0.03$, df = 1, n = 31 females, p = 0.87), but increased with mean male heterozygosity in the cross ($\chi^2 = 6.58$, df = 1, n = 31 females, p = 0.01, $\beta = 1.98 \pm 0.77$). This last result is to be taken with caution because of the unexpected correlation between male heterozygosity and sex-ratio (Supplementary material S1). Indeed, sex-ratio also affected the total number of mates for each female ($\chi^2 = 6.53$, df = 2, n = 31 females, p = 0.038, table 1), females in $80\%_F$ having fewer mates than females in $20\%_F$ ($\beta = -0.80 \pm 0.32$, p = 0.037). There was no difference between females in 20 and $50\%_F$ ($\beta = -0.21 \pm 0.28$, p = 0.472) nor between 80 and $50\%_F$ ($\beta = -0.58 \pm 0.29$, p = 0.11).

Proportion of partners

The proportion of mates regarding the number of males which produced offspring was not affected by female heterozygosity ($\chi^2 = 0.02$, df = 1, n = 31 females, p = 0.89) or mean male heterozygosity in the cross ($\chi^2 = 0.14$, df = 1, n = 31 females, p = 0.72), nor by mean male genetic similarity to the female ($\chi^2 = 0.51$, df = 1, n = 31 females, p = 0.47). It did not depend on sex-ratio either ($\chi^2 = 3.30$, df = 2, n = 31 females, p = 0.19, table 1).

b. Brood characteristics

i. Brood size

For all females in crosses 20, 50 and 80%$_F$ and for the 7 females in the only 90%$_F$ cross in which individuals were genotyped (priorly 80%$_F$, see material and methods), the number of offspring was not significantly affected by female heterozygosity ($\chi^2 = 1.30$, df = 1, n = 38 females, p = 0.26), mean relatedness to the fathers ($\chi^2 = 0.03$, df = 1, n = 38 females, p = 0.86), nor mean father heterozygosity ($\chi^2 = 0.02$, df = 1, n = 38 females, p = 0.88). The number of fathers had no influence ($\chi^2 = 0.001$, df = 1, n = 38 females, p = 0.97). The sex-ratio had no effect on brood size ($\chi^2 = 1.82$, df = 3, n = 59 females, p = 0.61, table 1) with females in 90%$_F$ included in the analysis.

ii. Genetic diversity

Heterozygosity

Mean brood heterozygosity increased with female heterozygosity ($F(1,27) = 17.60$, n = 38 females, $p < 0.001$, $\beta = 0.31 \pm 0.07$) and with mean fathers heterozygosity ($F(1,27) = 10.40$, n = 38 females, p = 0.001, $\beta = 0.3 \pm 0.10$), but decreased with mean relatedness to the fathers ($F(1,27) = 3.99$, n = 38 females, p = 0.046, $\beta = -0.24 \pm 0.12$). Mean brood heterozygosity did not depend on the number of fathers ($F(1,29) = 0.19$, n = 38 females, p = 0.66), nor on sex-ratio ($F(1,28) = 2.59$, n = 38 females, p = 0.29, table 1).

Allelic richness

Allelic richness within broods was not affected by female heterozygosity (χ^2 = 1.90, df = 1, n = 38 females, p = 0.16) nor mean male similarity to fathers (χ^2 = 0.83, df = 1, n = 38 females, p = 0.36), but increased with male heterozygosity (χ^2 = 5.01, df = 1, n = 38 females, p = 0.025, β = 0.12 ± 0.05). It also increased slightly with the number of fathers (χ^2 = 6.03, df = 1, n = 38 females, p = 0.014, β = 0.03 ± 0.01) and was influenced by the sex-ratio (χ^2 = 11.00, df = 2, n = 38 females, p = 0.004), with broods in 80%$_F$ having a lower allelic richness than broods in 20%$_F$ (β = -0.09 ± 0.03, p = 0.004), a trend for 80%$_F$ to have a lower richness than50%$_F$ (β = -0.05 ± 0.02, p = 0.07), and no difference between 20%$_F$ and 50%$_F$ (β = -0.04 ± 0.03, p = 0.32).

Discussion

In this study, we investigated the effect of both sex-ratio variations and individual genetic characteristics on the intensity and direction of sexual selection in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. (1) We observed that there was a trend for the proportion of inseminated females for each male to be affected by sex-ratio, and males sired a higher proportion of offspring in female biased sex-ratio. (2) Heterozygous males tended to inseminate more females and sired a higher proportion of offspring within a whole cross. (3) Females performed multiple mating whatever the genetic and sex-ratio conditions, and the total number of fathers in the brood was positively associated with brood allelic richness but did not affect brood size or heterozygosity.

In female-biased crosses, the number of matings required to inseminate every female is higher than in male-biased crosses, so a lower proportion of inseminated females due to male limitations in mating capacity could have been expected. However, the opposite trend has been observed. This means that males are not limited in the number of copulations they can perform under our conditions, which is confirmed by our controls with 90%$_F$ in which all surviving females were inseminated. This is also consistent with the literature on *A. vulgare* highlighting a high male mating potential (Moreau & Rigaud, 2003; Rigaud & Moreau, 2004), and also with previous work on the closely related species

Armadillidium nasatum, in which a single male could inseminate around 7 females in 4 days (Moreau & Rigaud, 2000). As such, our results probably reflect a lower male-male competition under female-biased conditions, in accordance with theory. This was not obvious in *A. vulgare*, where a high female mating capacity could have increased male mating opportunities and lowered the level of male competition for the access to females even under male-biased conditions.

Male heterozygosity did not increase the proportion of offspring sired within each brood, contrarily to what has been observed when two males were in competition for one female (Durand *et al.*, 2017). This difference with previous work could result from a less precise estimation of proportions in the present study, as the number of analysed offspring might not be high enough to be representative of the respective contributions of numerous males. Conversely, the number of males could also affect mechanisms of competition. For example, the presence of many males could lead to an increased risk of disturbance during sperm transfer, but it is difficult to conclude as long as we do not know more about how male heterozygosity affects mechanisms underlying male competition.

Even if heterozygous males did not sire a higher proportion of offspring within each brood they contributed to, they sired significantly more offspring within the whole cross (summing up all broods) than their less heterozygous competitors. This might reflect the proportion of inseminated females: indeed, more heterozygous males tended to inseminate a higher proportion of females, which is in line with the higher insemination success for heterozygous males observed in previous work (Durand *et al.*, 2017). The role played by male-male competition and female choice in such insemination success still remains to be determined. Anyhow, it is likely that more heterozygous males may contribute more to the next generation than other males, and may increase population global heterozygosity because of parent-offspring correlation in heterozygosity, correlation predicted by theory (Mitton *et al.*, 1993) and observed in this study. This process would have strong implications in population genetics regarding the evolution of genetic diversity over time.

Reproductive females mated with up to five males in a single reproductive event, and all of them could have access to at least one male whatever the sex-ratio. We ignore whether females

compete to mate with best quality males. Anyhow, more heterozygous females do not seem to obtain more partners, even when accounting for the number of available males. This suggests that heterozygosity does not impact sexual selection similarly in both sexes. Multiple paternity has recently been described to be widespread in natural populations (Valette *et al.*, 2017), but the present work sheds lights upon the timing under which matings occur: females can mate with numerous males in a relatively short period, despite the existence of a refractory behaviour in females (Moreau *et al.*, 2002). The number of fathers per brood is unsurprisingly higher under male-biased conditions, but does not affect brood size or heterozygosity. However, the number of fathers positively impacted allelic richness, even though the increase was weak. As the number of fathers is correlated to the sex-ratio but also to mean father heterozygosity, it is difficult to determine which one of those variables really impacts the number of alleles present in broods, but populations with a male-biased sex ratio (corresponding to a high number of fathers in broods) are likely to be more genetically diverse.

The next step towards a comprehensive approach of how sex-ratio variations affect processes responsible for genetic diversity maintenance is to include the distorters responsible for such variations. Indeed, infections are known to impact sexual selection (Beltran-Bech & Richard, 2014). The endosymbiont *Wolbachia* is responsible for a behaviour inappropriate to the continuation of matings in infected females, and males mate less and invest fewer sperms in such females (Moreau *et al.*, 2001). As such, the effect of heterozygosity on male success might be affected. More heterozygous males being more successful, such males could monopolise preferred non-infected females, leaving bad quality infected females to less diverse males. Conversely, if heterozygous male success results from a higher capacity to overcome female defence, such males might be more successful in attempting to mate with reluctant infected females. Infection with *Wolbachia* is definitely to be incorporated in future studies investing the importance of genetic characteristics in *A. vulgare*, because of its impact on both sexual selection and sex-ratio variations.

References

Aronsen, T., Berglund, A., Mobley, K.B., Ratikainen, I. & Rosenqvist, G. 2013. Sex ratio and density affect sexual selection in a sex-role reversed fish. *Evolution* **67**: 3243–3257.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2014. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *R Package Version 11-7 Httpcranr-Proj.*

Beltran, S. & Boissier, J. 2010. Male-biased sex ratio: why and what consequences for the genus *Schistosoma*? *Trends Parasitol.* **26**: 63–69.

Beltran, S., Cezilly, F. & Boissier, J. 2008. Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in Schistosomes. *Plos One* **3**: e3328.

Beltran-Bech, S. & Richard, F.J. 2014. Impact of infection on mate choice. *Anim. Behav.* **90**: 159–170.

Bonduriansky, R. 2001. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biol. Rev.* **76**: 305–339.

Bouchon, D., Rigaud, T. & Juchault, P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **265**: 1081–1090.

Chapman, J.R., Nakagawa, S., Coltman, D.W., Slate, J. & Sheldon, B.C. 2009. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Mol. Ecol.* **18**: 2746–2765.

Charnov, E.L., Hartogh, R.L.L., Jones, W.T. & Assem, J. van den. 1981. Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature* **289**: 27–33.

Coetzer, W.G., Downs, C.T., Perrin, M.R. & Willows-Munro, S. 2017. Testing of microsatellite multiplexes for individual identification of Cape Parrots (*Poicephalus robustus*): paternity testing and monitoring trade. *Peerj* **5**: e2900.

Coltman, D.W., Pilkington, J.G., Smith, J.A. & Pemberton, J.M. 1999. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* **53**: 1259–1267.

Cordaux, R., Bouchon, D. & Greve, P. 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends Genet.* **27**: 332–341.

Coulon, A. 2010. genhet: an easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 167–169.

Darwin, C. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex. By Charles Darwin ...* J. Murray, London.

Durand, S., Beauché, F., Richard, F.-J. & Beltran-Bech, S. 2015. How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*? *Ethology* **121**: 1122–1130.

Durand, S., Cohas, A., Braquart-Varnier, C. & Beltran-Bech, S. 2017. Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **71**: 90.

Eberhard, W.G. 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton.

Emlen, S. & Oring, L. 1977. Ecology, Sexual Selection, and Evolution of Mating Systems. *Science* **197**: 215–223.

Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford.

Fitzpatrick, J.L. & Evans, J.P. 2014. Postcopulatory inbreeding avoidance in guppies. *J. Evol. Biol.* **27**: 2585–2594.

Fox, J., Weisberg, S., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Ellison, S., *et al.* 2017. *car: Companion to Applied Regression*.

Fromhage, L., Kokko, H. & Reid, J.M. 2009. Evolution of mate choice for genome-wide heterozygosity. *Evolution* **63**: 684–694.

Gage, M.J.G., Surridge, A.K., Tomkins, J.L., Green, E., Wiskin, L., Bell, D.J., *et al.* 2006. Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Curr. Biol.* **16**: 612–617.

Giraud, I., Valette, V., Bech, N., Grandjean, F. & Cordaux, R. 2013. Isolation and characterization of microsatellite loci for the Isopod Crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in Terrestrial Isopods. *Plos One* **8**: e76639.

Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* **86**: 485–486.

Hamilton, W. 1967. Extraordinary Sex Ratios. *Science* **156**: 477-.

Hardy, O.J. & Vekemans, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* **2**: 618–620.

Hernandez, L.M., Blazer, D.G. & Institute of Medicine (US) Committee on Assessing Interactions Among Social, Behavioral, and Genetic Factors in Health. 2006. *Study Design and Analysis for Assessment of Interactions*. National Academies Press (US).

Hoglund, J., Piertney, S.B., Alatalo, R.V., Lindell, J., Lundberg, A. & Rintamaki, P.T. 2002. Inbreeding depression and male fitness in black grouse. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **269**: 711–715.

Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* **50**: 346–363.

Howard, H.W. 1940. The genetics of *Armadillidium vulgare* Latr I A general survey of the problems. *J. Genet.* **40**: 83-U11.

Jirotkul, M. 1999. Operational sex ratio influences female preference and male–male competition in guppies. *Anim. Behav.* **58**: 287–294.

Jones, O.R. & Wang, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 551–555.

Kempenaers, B. 2007. Mate choice and genetic quality: A review of the heterozygosity theory. In: *Advances in the Study of Behavior, Vol 37* (H. J. Brockmann, T. J. Roper, M. Naguib, K. E. WynneEdwards, C. Barnard, & J. Mitani, eds), pp. 189–278. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.

Kokko, H. & Jennions, M.D. 2008. Parental investment, sexual selection and sex ratios. *J. Evol. Biol.* **21**: 919–948.

Kvarnemo, C. & Ahnesjo, I. 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 404–408.

Laloi, D., Eizaguirre, C., Federici, P. & Massot, M. 2011. Female choice for heterozygous mates changes along successive matings in a lizard. *Behav. Processes* **88**: 149–154.

Landry, C., Garant, D., Duchesne, P. & Bernatchez, L. 2001. "Good genes as heterozygosity": the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **268**: 1279–1285.

Leclercq, Sb., Theze, J., Chebbi, M.A., Giraud, I., Moumen, B., Ernenwein, L., *et al.* 2016. Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 15036–15041.

Liker, A., Freckleton, R.P. & Székely, T. 2013. The evolution of sex roles in birds is related to adult sex ratio. *Nat. Commun.* **4**: 1587.

Macke, E., Magalhães, S., Bach, F. & Olivieri, I. 2011. Experimental evolution of reduced sex ratio adjustment under local mate competition. *Science* **334**: 1127–1129.

Mitton, J.B., Schuster, W.S.F., Cothran, E.G. & Defries, J.C. 1993. Correlation between the individual heterozygosity of parents and their offspring. *Heredity* **71**: 59–63.

Moreau, J., Bertin, A., Caubet, Y. & 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. 2000. Operational sex ratio in terrestrial isopods: interaction between potential rate of reproduction and *Wolbachia*-induced sex ratio distortion. *Oikos* **91**: 477–484.

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. B-Biol. Sci.* **270**: 1535–1540.

Moreau, J., Seguin, S., Caubet, Y. & Rigaud, T. 2002. Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial Crustacean. *Anim. Behav.* **64**: 569–577.

Poulin, R. & FitzGerald, G.J. 1989. Male-biased sex ratio in *Argulus canadensis* Wilson, 1916 (Crustacea: Branchiura) ectoparasitic on sticklebacks. *Can. J. Zool.* **67**: 2078–2080.

R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput. Vienna Austria HttpwwwR-Proj.*

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. & Moreau, M. 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. B-Biol. Sci.* **271**: 1941–1946.

Ryder, T.B., Tori, W.P., Blake, J.G., Loiselle, B.A. & Parker, P.G. 2010. Mate choice for genetic quality: a test of the heterozygosity and compatibility hypotheses in a lek-breeding bird. *Behav. Ecol.* **21**: 203–210.

Singmann, H., Bolker, B., Westfall, J., Aust, F., Højsgaard, S., Fox, J., *et al.* 2016. afex: Analysis of Factorial Experiments. *R Package V016-1 Httpsgithubcomsingmannafex*.

Surbida, K.L. & Wright, J.C. 2001. Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda : Oniscidea). *Physiol. Biochem. Zool.* **74**: 894–906.

Szulkin, M., Bierne, N. & David, P. 2010. Heterozygosity-Fitness Correlations: A Time for Reappraisal. *Evolution* **64**: 1202–1217.

Tregenza, T. & Wedell, N. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review. *Mol. Ecol.* **9**: 1013–1027.

Tregenza, T. & Wedell, N. 2002. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. *Nature* **415**: 71–73.

Valette, V., Durand, S., Bech, N., Grandjean, F. & Beltran-Bech, S. 2017. Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*? *J. Evol. Biol.* **30**: 235–243.

Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. & Grandjean, F. 2012. Effects of parasitic sex-ratio distorters on host genetic structure in the *Armadillidium vulgare-Wolbachia* association. *J. Evol. Biol.* **25**: 264–276.

Verne, S., Puillandre, N., Brunet, G., Gouin, N., Samollow, P.B., Anderson, J.D., *et al.* 2006. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 328–330.

Wade, M.J., Shuster, S.M. & Demuth, J.P. 2003. Sexual selection favors female-biased sex ratios: the balance between the opposing forces of sex-ratio selection and sexual selection. *Am. Nat.* **162**: 403–414.

Wang, J.L. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* **160**: 1203–1215.

Werren, J.H., Baldo, L. & Clark, M.E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 741–751.

Zeh, J.A. & Zeh, D.W. 1996. The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **263**: 1711–1717.

Supplementary Material S1

Table S1 correlations between explanatory variables used in our models. Correlations were performed with Spearman correlation tests, excepted for tests of the effect of sex-ratio on quantitative variables which were performed with Kruskal-Wallis tests with 2 degrees of freedom. Above diagonal: correlation coefficient or Kruskal-Wallis χ^2; below diagonal: p-values.

A. Statistical individuals: full-siblings groups in all broods (n=80)

	Pairwise male-female similarity	Male heterozygosity	Sex-ratio
Pairwise male-female similarity	-	-0.003	0.8
Male heterozygosity	0.98	-	20.11
Sex-ratio	0.96	<0.001	-

B. Statistical individuals: males (n=42)

	Mean male similarity to females within the cross	Male heterozygosity	Sex-ratio
Mean male similarity to females within the cross	-	0.04	1.4
Male heterozygosity	0.78	-	2.22
Sex-ratio	0.5	0.33	-

C. Statistical individuals: broods (n=31)

	Female heterozygosity	Mean female similarity to males within the cross	Mean male heterozygosity within the cross	Mean female similarity to fathers	Mean fathers heterozygosity	Number of fathers	Sex-ratio
Female heterozygosity	-	0.05	-0.07	0.02	0.05	-0.01	1.53
Mean female similarity to males within the cross	0.78	-	0.2	0.82	0.05	0.19	0.18
Mean male heterozygosity within the cross	0.71	0.27	-	0.21	0.73	0.73	21.88
Mean female similarity to fathers	0.92	<0.001	0.26	-	0.18	0.19	0.69
Mean fathers heterozygosity	0.79	0.81	<0.001	0.34	-	0.53	15.13
Number of fathers	0.96	0.31	<0.001	0.32	0.002	-	15.59
Sex-ratio	0.47	0.91	<0.001	0.71	<0.001	<0.001	-

Supplementary Material S2

Table S2 Full models (including all explanatory variables) and minimal models (including only terms with p<0.1 after simplification) presented in this study. Full models for which all terms were significant are presented in the "full model" column. df = degrees of freedom. Significant terms are shown in bold.

A. LMMs and GLMMs (p-values given by Wald χ^2 tests)

				Full model			Minimal model		
Result section	**Response variable**	**Random effect**	**Explanatory variables**	**χ^2**	**df**	**p**	**χ^2**	**df**	**p**
Crosses description	Pairwise male-female similarity	Male + Female	Male heterozygosity	0.08	1	0.78			
			Female heterozygosity	1.49	1	0.22			
Male success: insemination success	Insemination of at least one female[1]	Cross	Male heterozygosity	2.55	1	0.11			
			Mean male similarity to females within the cross	0.09	1	0.76			
			Sex-ratio	3.37	1	0.07	3.31	1	0.069
	Number of inseminated females (accounting for the number of available females)	Cross	Male heterozygosity	3.56	1	0.06	3.68	1	0.055
			Mean male similarity to females within the cross	0.45	1	0.50			
			Sex-ratio	5.61	2	0.06	5.47	2	0.065
Male success: offspring production	Number of offspring per female (accounting for the number of genotyped offspring for this female)	Cross/Male	Male heterozygosity	0,14	1	0,71			
			Pairwise male-female similarity	0,32	1	0,57			
	Number of offspring per female (accounting for the number of genotyped offspring for this female)	Cross/Male	Sex-ratio	**41.31**	**2**	**<0.001**			
	Number of offspring within the cross (accounting for the number of genotyped offspring for this cross)	Cross	Male heterozygosity	4.86	1	0.03	**4.96**	**1**	**0.026**
			Mean male similarity to females within the cross	0.39	1	0.53			
			Sex-ratio	13.78	2	0.001	**13.64**	**2**	**0.001**
Female strategies: number of sexual partners	Number of fathers in the brood	Cross	Female heterozygosity	0.05	1	0.83			
			Mean male heterozygosity within the cross	5.61	1	0.02	**6.58**	**1**	**0.010**
			Mean female similarity to males within the cross	0.03	1	0.87			
	Number of fathers in the brood	Cross	Sex-ratio	**6.53**	**2**	**0.038**			
	Number of fathers in the brood (accounting for the number of available males)	Cross	Female heterozygosity	0.02	1	0.89			
			Mean male heterozygosity within the cross	0.13	1	0.72			
			Mean female similarity to males within the cross	0.51	1	0.47			
	Number of fathers in the brood (accounting for the number of available males)	Cross	Sex-ratio	3.30	2	0.19			

[1] only 20 and 50% females crosses were included

A. continued

Result section	Response variable	Random effect	Explanatory variables	Full model χ^2	df	p	Minimal model χ^2	df	p
Female strategies: brood characteristics	Brood size	Cross	Female heterozygosity	1.30	1	0.26			
			Mean fathers heterozygosity	0.02	1	0.88			
			Mean female similarity to fathers	0.03	1	0.86			
	Brood size	Cross	Number of fathers	0.00	1	0.97			
	Brood size[2]	Cross	Sex-ratio	1.82	3	0.61			
	Brood allelic richness	Cross	Female heterozygosity	1.90	1	0.16			
			Mean fathers heterozygosity	4.85	1	0.028	**5.01**	**1**	**0.025**
			Mean female similarity to fathers	0.83	1	0.36			
	Brood allelic richness	Cross	Number of fathers	**6.03**	**1**	**0.014**			
	Brood allelic richness[2]	Cross	Sex-ratio	**11.00**	**2**	**0.004**			

[2] broods from 90%$_F$ crosses were included

B. LMs (p-values given by F-tests)

Result section	Response variable	Explanatory variables	F	df	p
Crosses description	Male heterozygosity	Female heterozygosity	0.05	1. 149	0.82
	Male heterozygosity	Sex-ratio	1.15	2. 42	0.25
	Female heterozygosity	Sex-ratio	0.77	2. 35	0.47
	Pairwise male-female similarity	Sex-ratio	0.36	2. 149	0.7
Female strategies: brood characteristics	Offspring heterozygosity	Female heterozygosity	17.60	1. 27	<0.001
		Mean fathers heterozygosity	10.40	1. 27	0.001
		Mean female similarity to fathers	3.99	1. 27	0.046
	Offspring heterozygosity	Number of fathers	0.19	1. 29	0.66
	Offspring heterozygosity	Sex-ratio	2.59	2. 28	0.29

III. Ce qu'il reste à faire et à comprendre

Une limitation statistique concernant cette étude mérite d'être mentionnée. Il existe en effet une différence dans l'hétérozygotie mâle moyenne observée entre les conditions de sex-ratios, probablement due au fait que malgré un effectif important d'animaux analysés (48 mâles), nous n'avons analysé que 8 réplicas. Afin d'éviter d'inclure deux variables dépendantes dans nos analyses, nous avons dû tester l'effet de l'hétérozygotie mâle moyenne et du sex-ratio sur nos variables dépendantes dans des modèles distincts. Pourtant, quand les deux variables ont un effet significatif, il nous est impossible de déterminer laquelle est réellement à l'origine de l'effet observé.

Une observation remarquable faite au cours de cette étude est que la taille des portées ne dépend pas de la similarité génétique entre les parents. Pourtant, dans les travaux présentés dans le chapitre I (Durand *et al.*, 2017), les parents les plus similaires génétiquement produisaient moins de descendants. Il est possible que multiplier les pères conduise à une homogénéisation dans la similarité parentale moyenne parmi les portées (et ainsi à une moins grande variance), ce qui expliquerait que nous ne puissions pas détecter d'effet de cette variable sur la taille de portée.

Afin de compléter cette étude en vue d'une publication scientifique, il sera nécessaire de réaliser le génotypage de quelques descendants issus de portées provenant de sex-ratio à 90% de femelles, 15 *pulli* ayant été prélevés pour chacune des portées concernées. Nous pourrons ainsi inclure des portées avec un seul père dans nos analyses, et ainsi parvenir à une conclusion plus solide en ce qui concerne les comparaisons de diversité génétique de ces portées en fonction du nombre de pères et de leurs paramètres génétiques.

D.Conclusion du chapitre II

Ce chapitre nous a permis de mettre en évidence l'omniprésence du comportement d'appariement multiple de la part des femelles chez *A. vulgare*, que ce soit en milieu naturel ou en laboratoire, confirmant le système d'appariement promiscuitaire de cette espèce. Le nombre de pères peut atteindre sept dans la population naturelle étudiée, et est impacté par la présence de l'endosymbionte *Wolbachia*, dont la souche la plus virulente est associée avec le nombre de pères le plus faible. L'accouplement multiple de la part des femelles est possible au sein d'une seule intermue avec jusqu'à cinq pères en condition de laboratoire, et la richesse allélique des portées augmente avec le nombre de mâles se partageant la paternité. Le nombre de pères est indépendant des caractéristiques génétiques de la femelle, mais les mâles les plus hétérozygotes tendent à se reproduire avec plus de femelles, ce qui se traduit par un plus grand nombre de descendants produits à l'échelle du croisement et pourrait impacter la diversité génétique à l'échelle de la population. Enfin, les conditions de sex-ratio pourraient altérer les mécanismes de sélection sexuelle basés sur la diversité génétique individuelle. Ces aspects, en particulier le système d'appariement, seront discutés en détail dans la discussion générale.

CHAPITRE III : IMPACT DE L'HÉTÉROZYGOTIE SUR LE PHÉNOTYPE

A.Introduction

Les travaux présentés dans les deux premiers chapitres de ce manuscrit suggèrent que la diversité génétique individuelle est impliquée dans les stratégies de reproduction chez *A. vulgare*. Cependant, l'impact de l'hétérozygotie sur des traits phénotypiques autres que reproductifs reste inconnu chez notre modèle, et nécessite une investigation plus poussée afin de mieux contextualiser nos découvertes sur les stratégies de reproduction.

I. Corrélations hétérozygotie-valeur sélective chez les invertébrés : une littérature peu abondante

Si la littérature est assez fournie concernant les HFC chez les modèles vertébrés, voire chez les végétaux, un rapide état des lieux montre que les invertébrés ont reçu relativement peu d'attention (à l'exception de la drosophile chez qui de nombreux travaux sur la dépression de consanguinité ont été réalisés (Charlesworth & Charlesworth, 1987)). Pour exemple, les méta-analyses sur le sujet comportent très peu de références sur les invertébrés, et seuls les arthropodes sont évoqués. Ainsi, dans leurs travaux portant sur la consanguinité en populations naturelles, Keller & Waller (2002) ont recensé neuf études sur des végétaux, 36 sur des vertébrés et une seule sur un insecte. Sur les 24 espèces étudiées par Coltman & Slate (2003), seules deux sont des crustacés, dont une étude n'ayant jamais été publiée. Ces deux mêmes études sont également les seules concernant les invertébrés parmi les études rassemblées par Chapman *et al.* (2009) malgré un échantillonnage plus important comptant 61 espèces. Seuls Reed & Frankham (2003b) ont investigué 13 jeux de données insectes sur les 34 regroupés par leur méta-analyse, mais ces jeux de données sont représentatifs de l'effort de quelques équipes de recherche seulement, avec trois espèces constituant la majorité de ces jeux de données (trois chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, quatre chez la mouche domestique *Musca*

domestica et quatre chez le papillon *Bicyclus anynana*). Les HFC restent donc à l'heure actuelle un domaine à explorer chez les modèles invertébrés.

II. Divers facteurs conditionnent la détection des HFC

1) Différents traits concernés

De nombreux traits phénotypiques sont connus pour être influencés par l'hétérozygotie. Sans prétention d'exhaustivité, on peut citer pêle-mêle la survie (Saccheri *et al.*, 1998), la fécondité (Price & Hadfield, 2014), le taux d'éclosion (Fox & Reed, 2010), diverses mesures morphométriques comme la taille du corps (Diehl & Biesiot, 1994) ou d'une partie du corps (Brambilla *et al.*, 2015), le taux de parasitisme (Whitehorn *et al.*, 2011; Kaunisto *et al.*, 2013), la capacité à monopoliser un territoire (Hoglund *et al.*, 2002)… Ces traits peuvent être regroupés en différentes catégories (Roff & Mousseau, 1987), à savoir (i) les traits d'histoire de vie qui sont directement liés à la valeur sélective comme la fécondité ou le succès reproducteur, (ii) les traits morphométriques regroupant tous les caractères métriques et (iii) les traits physiologiques concernant le métabolisme et l'immunité. La théorie prédit que les traits d'histoires de vie sont plus susceptibles d'être affectés par la dépression de consanguinité, puisqu'ils dépendent de plus de *loci* sur lesquels des mutations peuvent s'accumuler (Houle *et al.*, 1996). Une méta-analyse par Coltman & Slate (2003) confirme cette hypothèse : l'effet de l'hétérozygotie sur les traits d'histoire de vie est deux fois plus important que celui sur les traits morphométriques. Cependant, cela n'exclut pas que certains traits morphométriques ou physiologiques puissent être fortement impactés par l'hétérozygotie. Szulkin *et al.* (2010) recommandent ainsi l'étude de traits résultant d'un grand nombre de *loci*, ou étant fortement liés à la valeur sélective. Le choix des traits mesurés peut donc conditionner l'observation de HFC significatives.

2) Des effets souvent faibles

L'une des principales difficultés concernant les HFC concerne leur faible taille d'effet* (David, 1998; Coltman & Slate, 2003; Chapman *et al.*, 2009). D'après Chapman *et al.* (2009), l'hétérozygotie

sur des marqueurs microsatellites explique généralement moins d'1 % de la variance dans les traits mesurés. Des effets de faible taille étant souvent difficiles à détecter, diverses recommandations ont été formulées pour la bonne réalisation des études de HFC (Szulkin *et al.*, 2010).

Une mesure permettant d'augmenter la puissance d'un test est d'en augmenter l'effectif. Ainsi, Coltman & Slate (2003) recommandent l'échantillonnage de plus de 600 individus pour détecter une HFC avec une taille d'effet de 0,1 pour une puissance de 0,8. Ces conditions sont bien entendu rarement approchées dans la littérature. Il est en particulier difficile de récolter autant d'individus dans des petites populations d'espèces menacées et, même en conditions expérimentales, un tel échantillonnage n'est pas forcément techniquement réalisable.

L'une des hypothèses sur lesquelles reposent les HFC est que l'hétérozygotie aux marqueurs neutres mesurés est représentante de celle du génome dans son ensemble, ainsi que du coefficient de consanguinité des individus (Szulkin *et al.*, 2010). Si tel est le cas, alors l'hétérozygotie devrait être corrélée entre les marqueurs mesurés, phénomène connu sous le nom de déséquilibre d'identité (David *et al.*, 2007, cf. Introduction). Il est donc recommandé d'effectuer une mesure de ce déséquilibre pour chaque jeu de marqueurs, afin d'estimer leur capacité à refléter l'hétérozygotie du génome (David *et al.*, 2007; Szulkin *et al.*, 2010; Stoffel *et al.*, 2016). Cette capacité peut être améliorée en augmentant le nombre de marqueurs utilisés. En effet, une simulation par Balloux *et al.* (2004) a mis en évidence que la corrélation entre hétérozygotie et coefficient de consanguinité augmente avec le nombre de marqueurs, et que la dizaine ou vingtaine de marqueurs microsatellites typiquement utilisée par la majorité des études n'est généralement pas suffisante pour observer un déséquilibre d'identité significatif. Cependant, avec le développement des technologies de séquençage, les génomes peuvent désormais être scannés à grande échelle pour un moindre coût. Des marqueurs de type SNP peuvent ainsi être obtenus à l'échelle individuelle pour des centaines voire milliers de marqueurs, et commencent à faire leur apparition dans les études sur les HFC (Forstmeier *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2014a).

Enfin, la population étudiée elle-même peut jouer sur notre capacité à détecter les HFC. En effet, des variations dans les niveaux d'hétérozygotie des individus (et donc dans leur coefficient de consanguinité) sont nécessaires pour observer des variations de traits sous l'hypothèse d'une HFC. Ainsi, même dans des populations très consanguines, l'observation de HFC n'est pas attendue s'il y a peu de variance dans le coefficient de consanguinité (Balloux *et al.*, 2004; Szulkin *et al.*, 2010). Une faible variance en populations naturelles pourrait donc expliquer la difficulté à détecter des HFC significatives. En conséquence, l'approche expérimentale peut être avantageuse pour l'étude des HFC en permettant de manipuler la variance en consanguinité, et donc en hétérozygotie. De nombreuses études réalisent ainsi des croisements contrôlés entre individus plus ou moins apparentés afin d'obtenir des animaux qui diffèrent dans leur degré de consanguinité (Weeks *et al.*, 2009; Pilakouta *et al.*, 2016; Huo *et al.*, 2017).

III. Qu'en est-il chez *A. vulgare* ?

Ce chapitre a pour but de pallier à notre manque de connaissances en ce qui concerne l'existence de HFC dans notre modèle d'étude isopode terrestre. Une première partie permet de déterminer comment la production de descendants plus ou moins consanguins est altérée par les caractéristiques génétiques de leurs parents, ainsi que de comparer la qualité de ces descendants à travers leur survie et leur croissance. La deuxième partie de ce chapitre vise à étudier l'impact de l'hétérozygotie sur l'immunocompétence des animaux, notamment en situation de *challenge* immunitaire. Afin d'optimiser nos chances de détecter des HFC sur le cloporte, les recommandations précédemment énoncées pour ce type d'étude ont été prises en compte. Ainsi, les deux études portent sur des traits pouvant fortement impacter la valeur sélective et étant donc susceptibles d'être sujets à des HFC. La première étude a été réalisée à partir de croisements contrôlés consanguins ou non, dans l'objectif d'accroître la variance dans l'hétérozygotie, cette expérience coûteuse en main-d'œuvre ne nous permettant pas de travailler sur un fort effectif. Pour la deuxième étude, un effectif plus important mobilisant plus de 200 individus a été utilisé, et le nombre de marqueurs génétiques sera prochainement augmenté via le développement de marqueurs de type SNP sur notre modèle.

B. Production de descendants hétérozygotes

I. Présentation de l'étude

Durant ma thèse, nous avons pu montrer que la diversité génétique individuelle a un impact sur la production de descendants chez le cloporte, puisque moins de descendants sont observés juste après la naissance pour les parents les plus génétiquement similaires (Durand *et al.*, 2017). A l'heure actuelle les mécanismes sous-tendant ce phénomène restent inconnus, mais l'expression d'allèles délétères présents à l'état homozygote chez les descendants pourrait être responsable d'un échec de développement important quand les parents sont génétiquement similaires, comme souvent en cas de dépression de consanguinité (Charlesworth & Willis, 2009). A l'inverse, les parents similaires pourraient moins investir dans la production de descendants homozygotes de moins bonne qualité. Dans ce dernier cas, cette baisse d'investissement pourrait avoir lieu avant fécondation (à travers une moindre production d'œufs par la femelle, ou un transfert d'une plus faible quantité de sperme par le mâle) ou après fécondation (à travers un contrôle par la femelle du nombre d'œufs fécondés par exemple). Par exemple, chez la drosophile *Drosophila nigrospiracla*, les femelles accouplées avec leur frère pondent moins d'œufs, malgré la présence de spermatozoïdes viables dans leur spermathèque (Markow, 1997). Ces hypothèses ont été testées dans la publication suivante, acceptée pour publication dans la revue *Evolution and Development.* Pour ce faire, nous avons réalisé un ensemble de croisements entre parents plus ou moins apparentés (frère et sœur ou non apparentés), et avons disséqué les femelles en fin d'incubation afin de mesurer le nombre total d'œufs pondus, la proportion d'œufs fécondés et la proportion de *mancae* développés dans le *marsupium* (**Figure 10**). Il ressort de nos analyses qu'aucune de ces trois variables n'est affectée significativement par la similarité entre les parents, même s'il faut souligner qu'un effectif assez faible a été utilisé et pourrait être responsable d'une puissance insuffisante. La diminution du nombre de descendants pour les parents similaires pourrait alors être causée par des évènements de mortalité ayant lieu peu avant ou peu après la naissance.

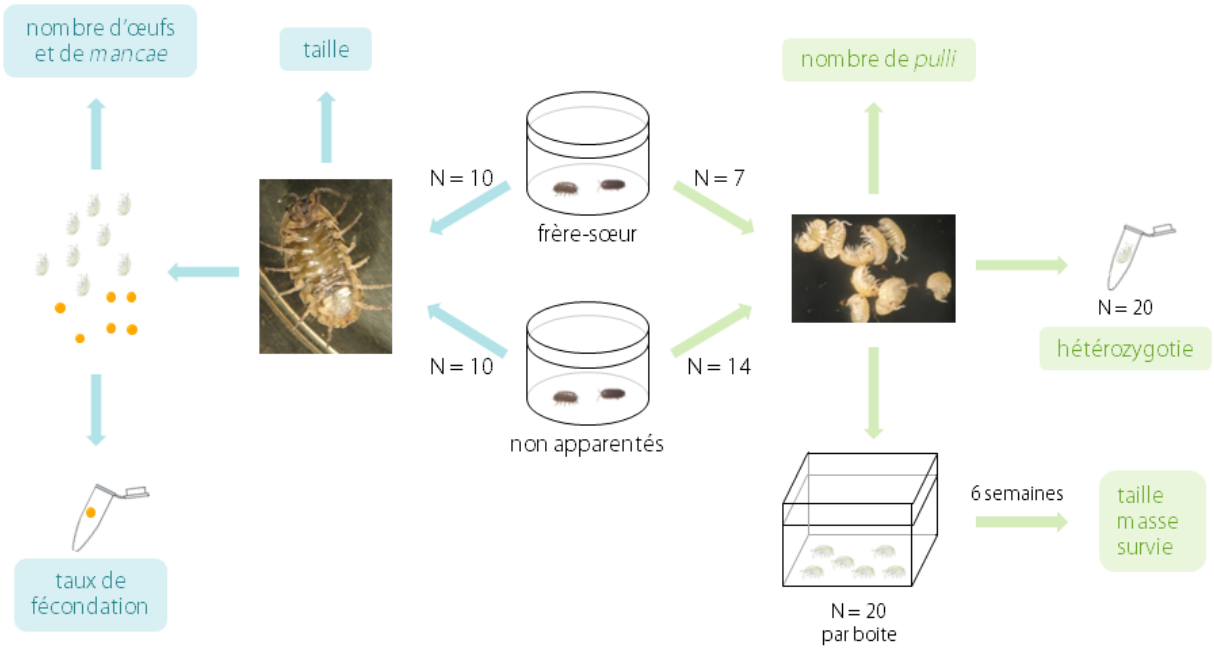

Figure 10 Schéma du protocole de cette étude. En bleu sont représentées les mesures effectuées pour étudier la production des descendants (avant la naissance), en vert les mesures effectuées pour étudier la qualité des descendants (après la naissance). Photographies UMR CNRS 7267.

Tous nos travaux reposent sur l'hypothèse que les descendants plus hétérozygotes sont de meilleure qualité, toutefois cette hypothèse reste à démontrer chez notre modèle d'étude. Nous avons donc réalisé un autre ensemble de croisements entre parents plus ou moins apparentés pour obtenir des descendants plus ou moins hétérozygotes, que nous avons placés dans des conditions d'élevage identiques afin de suivre leur survie et leur croissance au bout de six semaines (**Figure 10**). Ce choix de six semaines est d'autant plus justifié que les stades jeunes sont souvent plus sensibles à la dépression de consanguinité (David *et al.*, 1997). Malgré cela, aucune variation de croissance ou de survie n'est corrélée à l'hétérozygotie des descendants ou à la similarité génétique des parents. Si l'hétérozygotie impacte réellement ces traits, il est possible que ses effets apparaissent plus tard dans la vie des animaux, ou uniquement dans certaines conditions, notamment dans des conditions stressantes comme cela est observé chez d'autres modèles (Da Silva *et al.*, 2006).

Nous avons également profité de ces deux expériences pour compléter nos connaissances sur l'effet de l'hétérozygotie sur les traits de vie des adultes, en recherchant des corrélations entre les variables mesurées précédemment et l'hétérozygotie des parents. Il en ressort une tendance

intéressante entre hétérozygotie et taille des femelles, à mettre en relation avec un effet positif de l'hétérozygotie sur le nombre total d'œufs pondus. Cet effet pourrait se traduire par un meilleur potentiel de reproduction pour les femelles plus hétérozygotes. Malgré cela, les femelles les plus hétérozygotes ne produisent pas plus de descendants *in fine*. Nous supposons que d'autres paramètres, tels qu'un échec de développement ou une mortalité des descendants ayant lieu indépendamment de l'hétérozygotie de la femelle, masquent la production d'œufs plus importante des femelles hétérozygotes. Pour mettre en évidence un avantage des femelles hétérozygotes sur la production effective de descendants, un effectif beaucoup plus important serait nécessaire.

II. Publication "Producing offspring in *Armadillidium vulgare*: effects of genetic diversity and inbreeding", acceptée dans *Evolution and Development*

Durand Sylvine, Loiseau Vincent, Prigot Cybèle, Braquart-Varnier Christine, Beltran-Bech Sophie

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073 POITIERS, France

Telephone: +33 5 49 36 64 08

Fax: +33 5 49 45 40 15

Email: durand.sylvine@gmail.com

Abstract:

Genetic diversity is known to be correlated to fitness traits, and inbred individuals often present lower values for life history traits. In this study, we attempt to quantify how inbreeding affects such traits in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* by performing inbred and non-inbred crosses under laboratory conditions. We estimated genetic characteristics of parents and offspring, and linked them to fecundity and fertility measures, as well as offspring growth and survival. Our study shows that a decrease in offspring number might result from mortality around birth, but not to changes in fecundity, fertilization rate or developmental failure between inbred and non-inbred crosses. More heterozygous females tended to be bigger and had a higher fecundity, which could have implication in mate choice. No effect of inbreeding was detected on offspring growth and survival after birth. These results can be related to previously observed effects of genetic characteristics on mating strategies in *A. vulgare*, and could shed light on mechanisms of inbreeding avoidance in this species.

Keywords: heterozygosity, genetic similarity, crustacean

Introduction

Heterozygosity-fitness correlations (HFC) have been a long-standing study subject in evolutionary biology over several decades, and have been detected in a wide range of taxa (Chapman, Nakagawa, Coltman, Slate, & Sheldon, 2009; David, 1998). As such, heterozygous individuals often perform better in fitness-related traits like reproductive success (Heath et al., 2002; White, Eason, Jamieson, & Robertson, 2015), resistance against parasites (Kaunisto, Viitaniemi, Leder, & Suhonen, 2013; Whitehorn, Tinsley, Brown, Darvill, & Goulson, 2011) or competitive abilities (Valimaki, Hinten, & Hanski, 2007). In this context, different mating strategies increasing offspring heterozygosity are expected, such as mating with dissimilar individuals (Beltran, Cezilly, & Boissier, 2008; Tregenza & Wedell, 2000), or more heterozygous individuals (Lehmann, Keller, & Kokko, 2007), and have been demonstrated in several species (Kempenaers, 2007).

The origins of HFC are still debated (Hansson & Westerberg, 2002; Szulkin, Bierne, & David, 2010), but one of the most commonly admitted hypothesis is that they result mainly from inbreeding depression in natural populations (Szulkin et al., 2010). Indeed, inbreeding leads to decreased heterozygosity, and its detrimental effects implying recessive deleterious alleles are very well described in the literature (Keller & Waller, 2002). Decreased heterozygosity should be correlated between loci dispersed throughout the genome (Szulkin et al., 2010), a phenomenon known as identity disequilibrium (ID). Variability in inbreeding is thus required to observe significant ID, so that low levels of inbreeding in natural populations might explain why HFC are generally weak in the wild (Chapman et al., 2009). Another issue regarding HFC studies is that most studies are generally limited to 10 to 20 microsatellites markers, Which such small panels, neutral marker heterozygosity might not represent genome-wide heterozygosity (absence of ID) and inbreeding levels (Balloux, Amos, & Coulson, 2004), so that HFC should be discussed with caution, and ID should ideally be measured for each set of markers (Szulkin et al., 2010).

Life history traits are good candidates for HFC compared to morphological traits because they involve numerous loci, potential targets for recessive deleterious mutations (Houle, Morikawa, & Lynch, 1996; Szulkin et al., 2010). Indeed, more heterozygous individuals usually present better

growth as in molluscs (Singh & Zouros, 1978) or crustaceans (Diehl & Biesiot, 1994; Bierne, Beuzart, Vonau, Bonhomme, & Bédier, 2000), or a better survival as in birds (Velando, Barros, & Moran, 2015) or annelids (McElroy, Presley, & Diehl, 1999). But one of the traits which has received the most attention is offspring production, since inbred crosses often experience a decrease in fertility, i.e. offspring number, as observed in arthropods (Lihoreau, Zimmer, & Rivault, 2008; Müller & Müller, 2016).It is likely that the homozygous state of loci with deleterious recessive alleles leads to a decrease in inbred offspring fitness (Charlesworth & Willis, 2009). Another hypothesis predicted by theory is that a female mating with a relative should increase her parental investment in inbred offspring, therefore reducing their number (Duthie, Lee, & Reid, 2016). However, the possibility that parents decrease their investment in such broods to limit energetic expenditure in producing bad quality homozygous offspring has received little attention (Bilde, Maklakov, & Schilling, 2007).

Offspring production results from several pre- and post-zygotic steps taking place before birth, namely (i) egg production by female, (ii) fertilisation, and (iii) embryo development until birth. **(i)** The number of eggs produced by a female, i.e. her fecundity, can vary according to male traits, as in *Drosophila melanogaster* and in the scorpion fly *Harpobittacus nigriceps* where females adapt the number of laid eggs as a function of the size of the male they mated with (Pitnick, 1991; Thornhill, 1983). However to this day, no study has demonstrated that inbreeding could affect female reproductive effort, i.e. that females in inbred crosses lay fewer eggs than in outbred crosses (Müller & Müller, 2016). **(ii)** It is now well recognized that females have an active role during fertilisation and are able to prevent sperm from one male to fertilise eggs (Eberhard, 1996; Firman, Gasparini, Manier, & Pizzari, 2017), especially in the context of inbreeding avoidance (Fitzpatrick & Evans, 2014), even though there is currently no evidence that females mated to a single related male might decrease their investment in inbred offspring by preventing fertilisation. Moreover, males can adjust their investment in function of female quality (Moreau, Bertin, Caubet, & Rigaud, 2001; Wedell, Gage, & Parker, 2002) which may lead to sperm shortage for fertilisation and result in smaller broods (Rondeau & Sainte-Marie, 2001). Males thus could potentially decrease the number of sperm transferred to a related female (Lewis & Wedell, 2009). Finally, the recognition between egg and sperm can be

mediated by molecules, carried on nuclei, gamete surface or in reproductive fluids, and such recognition can prevent fertilisation between too similar partners, at least in case of multiple mating (Firman & Simmons, 2015). **(iii)** The best known cause of developmental failure in the context of inbreeding is the expression of recessive deleterious alleles in inbred homozygous individuals, described in a wide variety of species (Jin, Ho, Speed, & Gill, 1995; McCune et al., 2002). However, females might also invest less energy in some embryos, therefore preventing the full development of inbred offspring, but this mechanism has never been investigated to our knowledge.

The common woodlouse *Armadillidium vulgare* is an appropriate model to investigate the effect of inbreeding on offspring production and quality. Mating strategies expected to optimize offspring genetic diversity have been highlighted in this species: males presented to two unrelated females display a precopulatory preference towards the most genetically dissimilar female, provided both females offer a wide enough range of genetic similarity to the male (Durand, Beauché, Richard, & Beltran-Bech, 2015). Moreover, when two males are allowed to reproduce simultaneously with the same female, paternity success is higher for the most heterozygous male, and in cases where a single male produces offspring, this male is the most dissimilar to the female (Durand, Cohas, Braquart-Varnier, & Beltran-Bech, 2017). So far, more genetically similar parents have been shown to produce fewer offspring when counted within three days after birth (Durand et al., 2017), but the underlying physiological mechanisms are unknown. The presence of a male is known to positively impact female fecundity, compared to females housed alone or with another female (Lefebvre, 2002). This male effect could be altered by male quality, such as heterozygosity or similarity to the female. Moreover, the presence of a potential correlation between other fitness traits and heterozygosity in *A. vulgare* remains to be determined.

In this study, we investigated offspring production and quality before and after birth in *A. vulgare*. To do so, we performed inbred and non-inbred crosses in two experiments, each with a specific objective. (1) We aimed at obtaining insights on the mechanisms underlying the low number of offspring for more similar parents. To do so, we tested whether the low number of inbred offspring resulted (i) from modulation of egg production, by counting the total number of eggs laid by the

female; (ii) from a decreased fertilisation level by determining if undeveloped eggs were fertilised or not using genotyping methods, or (iii) from the interruption of embryo development, by estimating the proportion of viable offspring right before birth. (2) We also investigated whether offspring heterozygosity might affect life-history traits. We thus compared survival, size and weight after six weeks between inbred and non-inbred offspring. In both experiments, parents have been genotyped using microsatellites to calculate their pairwise genetic similarity and to investigate a potential effect of their heterozygosity on fitness traits.

Material and Methods

Animals: biology and breeding

All *Armadillidium vulgare* specimens descend from individuals sampled in Helsingör, Denmark in 1982. Since then, animals have been reared under laboratory conditions at 20°C under the natural photoperiod of Poitiers (46°35'N; 0°20'E) in plastic boxes containing humid loam, and fed with carrot slices and dried linden leaves *ad libitum*. Controlled breeding for the maintenance of the lineage over years is performed as follows: once a year, reproductive couples consisting of virgin one-year-old individuals are selected in order to avoid inbreeding, then isolated in small boxes with humid loam and food under a stimulating photoperiod (18L: 6D). After mating, the female undergoes a parturial moult leading to the formation of the *marsupium.* This ventral pouch, consisting of five pairs of oostegites covering the first five sternites, receives the eggs after fertilisation and maintains them in a marsupial fluid allowing nutrient exchanges with the mother (Appel, Quadros, & Araujo, 2011). During one month, eggs develop into embryos, then in *mancae* (Surbida & Wright, 2001), and finally exit the *marsupium* when oostegites open. Around 24h after birth, the *mancae* undergo their first moult and become *pulli* as they gain their seventh leg pair (Surbida & Wright, 2001). The *pulli* are transferred a few days after birth into a bigger box with loam and food. After three months, once sexual characters have appeared but before sexual maturity, young males and females are placed in separate boxes, enabling us to obtain virgin adults. For the maintenance of the lineage, about 40 crosses have been

performed following this protocol each year. Each of the 40 broods provides at least one breeder for the next generation.

Experiment 1: influence of inbreeding on offspring production (pre-birth measures)

Crosses

Twenty crosses were performed with one-year-old virgin individuals, in order to obtain groups of offspring differing in heterozygosity. Ten inbred crosses were realized between siblings (sibling crosses) and ten non-inbred crosses between individuals sharing no common ancestor over the two last generations (non-sibling crosses). Crosses were performed in the same conditions as usual breeding, after having collected a leg from each individual (male and female) with thin tweezers for DNA extraction.

Once gravid, females were controlled regularly to follow the developmental stage of the offspring. When we could distinctly see the eyes of *mancae* through the oostegites (between three and four weeks after the female was detected gravid), females were placed at -20°C to enable subsequent dissections of the *marsupium*.

Dissections

Females were first measured using a binocular magnifier equipped with a crossline micrometer and a piece of graph paper to calibrate measures. They were then dissected individually in a watch glass filled with Ringer solution for woodlouse (394mM NaCl, 2mM KCl, 2mM CaCl2, 2mM NaHCO3). The legs were pulled out to facilitate sampling and oostegites were carefully removed from the body. Offspring and eggs were removed one by one from the *marsupium* cavity and counted, and their development stage was noted as follows: (i) “undeveloped egg”, for eggs filled with small yolk granules and surrounded by the chorion, (ii) “embryo” for offspring at any stage having shed the chorion but still within the vitelline membrane, and (iii) “*manca*” for offspring having hatched from

the vitelline membrane; such individuals show dark brown eyes and distinctly visible pereiopodes and antennae.

For later comparison between sibling and non-sibling crosses, female fecundity was estimated as the total number of eggs having been laid in the *marsupium* (i.e. sum of undeveloped eggs, embryos and *mancae*). Undeveloped eggs were individually placed into the wells of a PCR plate, in order to extract their DNA and determine whether they were fertilised or not. Then, we calculated the proportion of *mancae* relatively to female fecundity.

One female was removed from the dataset because the left side of her *marsupium* contained only undeveloped eggs, whereas the right side contained *mancae*. It seems that the left side of this female (*A. vulgare* females present two genital apertures) was not inseminated, so the eggs laid in the left side were not fertilised at all, which made comparison with other females (with both sides fertilised) irrelevant.

Experiment 2: influence of inbreeding on offspring quality (post-birth measures)

Crosses

Twenty-one crosses were realized to obtain groups with different genetic diversity in the offspring resulting from different degrees in parental similarity. Initially, seven crosses were realized between siblings (sibling crosses), seven between cousins (cousin crosses) and seven between unrelated individuals (unrelated crosses). However, we found that there was no significant difference in parental genetic similarity between cousin and unrelated crosses (see Appendix 1). Hence, we decided to gather cousin and unrelated into the single category “non-sibling”, so that we ended up with seven sibling crosses and fourteen non-sibling crosses. All crosses were performed in the same conditions as in experiment 1, after having collected a leg from each animal.

Three weeks after females have been noticed gravid, they were removed for humid loam and isolated. Since then, females were controlled regularly to optimize *pulli* collection as soon as possible

after birth in order to avoid cannibalism issues (Durand, personal observations). However, *pulli* are very fragile following birth, especially as they moult in their first 24h. To avoid any damaging manipulation of moulting individuals, we waited until we could see that their gut was full through their transparent cuticle, indicating that they were able to eat, which they cannot do before they have moulted. Once the *pulli* reached this stage (between 24 and 48h after birth), cross fertility was estimated by counting offspring while collecting them carefully with a thin paint brush. Then, 20 *pulli* were individualized in the wells of a PCR plate for subsequent DNA extraction to estimate heterozygosity level in offspring for each cross (cf. Molecular analyses), and 20 others were put aside for growth assessment.

Growth measures (survival, weight and size)

The 20 *pulli* were immediately placed in a new plastic box (294 cm²) containing 80g of loam humidified with 10mL of water, along with 0.6g of dried linden leaf. As *pulli* are very sensitive to dryness, 10mL of water was added to each box every two weeks. After six weeks of growth at 20°C and under 18L:6D photoperiod, each box was carefully scrutinized to retrieve all the surviving *pulli* and count them. *Pulli* that were not retrieved were considered dead. Surviving *pulli* were individually weighted to the nearest 0.1mg with a Sartorius ED124S analytical balance. Afterwards, animals were measured with a crossline micrometer placed in a binocular magnifier and a piece of graph paper. To do so, each *pullus* was deployed and observed ventrally, stuck between a small Petri dish (on the dorsal side) and a circle of transparent plastic (on the ventral side) to prevent the *pullus* to bend and ensure a correct measure.

For statistical analyses, some individuals were removed from the dataset. Indeed, moulting leads to the emptying of the gut, resulting in a lower weight for such individuals and thus a potential bias. Moreover, as the cuticle is more fragile, there is a risk for those individuals to be not deployed properly, which might bias size measure. As such, we did not include individuals right before moult (characterized by the presence of white calcium plate on sternites (Moreau & Rigaud, 2002) and

emptied gut), during moult, and right after moult (unfinished hardening of the cuticle and empty gut) in statistical analyses.

Molecular analyses

DNA extraction

DNA from all the adult individuals (n=82) was extracted using a phenol-chloroform extraction as in Durand et al. (2015). DNA was diluted to 1/20th prior to PCR.

For eggs in experiment 1 (n=469), we adapted a protocol from Carvalho, Ja, & Benzer (2009) which allows to extract DNA from very small samples. Eggs were incubated in 9.8µL of buffer A (10mM Tris, 1mM EDTA, 25mM NaCl) and 0.2µL of proteinase K for three hours at 37°C, then for three minutes at 95°C. There was no dilution for those samples prior to PCR.

As *pulli* were numerous in experiment 2 (n=380, i.e. 20 *pulli* for each of the 19 broods), a Chelex extraction was used for these samples due to its rapidity. In this case, samples were incubated without crushing in 120µL of water, 20µL of a 5% Chelex solution (Sigma Aldrich) and 10µL proteinase K at 56°C for three hours, then at 95°C for ten minutes. DNA for these samples has not been diluted prior to PCR.

Genotyping

Eleven microsatellite markers (Giraud, Valette, Bech, Grandjean, & Cordaux, 2013; Verne et al., 2006) were gathered into three multiplexes using 5' fluorescein labeled forward primers, and amplified in the same conditions as in Durand et al. (2015) (Appendix 2) for each adult and *pullus* sample. However, only one multiplex was amplified for egg samples, as the aim was not to obtain the full genotype of the individual but to determine whether the egg was fecundated (i.e. whether paternal alleles were present or not). To do so, for each cross in experiment 1, we first genotyped each parent, then chose the one multiplex for which both parents shared the fewer alleles and proceeded to PCRs on eggs in the same conditions as above for a single multiplex.

Afterwards, for all samples, a mix of 0.75µL of PCR products, 9.25µL of deionized formamide and 0.25µL of size ladder GeneScan ROX 500 (Applied Biosystems) was denaturated three minutes at 95°C before being processed by electrophoresis in an automated sequencer (Applied Biosystems 3130 Avant). Alleles were then scored using the software GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).

General genetic information

The software FSTAT (Goudet, 1995) was used to obtain expected heterozygosity and F_{IS} values to test for Hardy-Weinberg equilibrium for each locus on adults. The measure g_2 (David, Pujol, Viard, Castella, & Goudet, 2007) was calculated to estimate whether our set of markers allowed for detecting HFC resulting from genome-wide effects of inbreeding. Under this hypothesis, heterozygosity should be correlated between markers and g_2 should be positive, provided there is variance in inbreeding (Szulkin et al., 2010). We used the package "inbreedR" (Stoffel et al., 2016) in the program R to calculate g_2 using the genotypes of *pulli* obtained in experiment 2, because those are the individuals experimenting different levels of inbreeding, contrarily to parents in which there is no variance in inbreeding.

Individual genetic indexes

Within each set of parents (experiment 1 or 2), pairwise genetic similarity was determined for each reproductive couple with the *r* coefficient of Wang (2002). This coefficient was calculated using the software SPAGeDi v1.5 (Hardy & Vekemans, 2002) and ranges from -1 (completely dissimilar individuals) to 1 (completely similar individuals). Additionally, individual genetic diversity for parents in both experiments and *pulli* in experiment 2 was estimated with the PHt index (proportion of heterozygous loci), calculated using the "GenHet" function (Coulon, 2010) written for the program R. This index ranges from 0 (no heterozygous loci) to 1 (all loci heterozygous).

Statistical analyses

Analyses with crosses or broods as statistical units ($n \leq 20$ for experiment 1 and $n \leq 21$ for experiment 2) were realized with non-parametric tests such as Spearman correlations and Mann-Whitney rank sum tests.

For analyses on fecundity, as there is a known positive relationship between female size and fecundity in *A. vulgare* (Sutton et al., 1984) which is confirmed in our study (see results section), we created the variable "size-corrected fecundity" by dividing fecundity by female size, so that we could compare females varying in size.

Analyses on offspring weight and size for experiment 2 were performed with General Linear Mixed Models (GLMMs), including the identity of the brood as a random effect. Either offspring size or weight were included in models as response variable and explanatory variables were either (i) male and female heterozygosity, (ii) parental genetic similarity, (iii) type of cross or (iv) mean observed offspring heterozygosity depending on the model. No interaction was included in models with both male and female heterozygosity as explanatory variables because such interaction does not correspond to any biological hypothesis. GLMMs were realized with an identity link and a variance given by a gaussian distribution, according to the distribution of the variables weight and size. Residuals were checked for normality, and model goodness-of-fit was tested using Pearson χ^2 test (Agresti, 2002).

All statistical analyses were performed on R v3.3.0 (R Development Core Team, 2013). The function "lmer" from the "lme4" package (Bates, Maechler, Bolker, & Walker, 2014) was used to construct GLMMs, and p-values for GLMMs were obtained with the function "mixed" from the package "afex" (Singmann et al., 2016). Significance threshold was set at $\alpha=0.05$, and mean parameter estimates are given ± standard error. P-values lower than 0.1 were considered as trends.

Results

General genetic information

The number of alleles, expected and observed heterozygosity as well as F_{IS} values for each marker are presented in table 1. The value of g_2 calculated from *pulli* genotypes from experiment 2 did not differ significantly from 0 ($g_2 = 0.010 \pm 0.007$, p=0.07).

Table 1 General information about microsatellite markers used in this study on all adult individuals (n=82). He: expected heterozygosity, Ho: observed heterozygosity. There was no significant value of F_{IS}.

Locus	Number of alleles	He	Ho	F_{IS}
Av1	5	0.66	0.62	0.062
Av2	4	0.49	0.51	-0.036
Av4	5	0.57	0.5	0.116
Av5	6	0.81	0.70	0.145
Av9	3	0.40	0.40	-0.03
Av3	6	0.66	0.67	-0.015
Av6	3	0.61	0.52	0.139
Av56	6	0.71	0.83	-0.168
Av18	4	0.61	0.61	-0.008
Av32	6	0.65	0.70	-0.071
Av63	2	0.23	0.27	-0.149

Experiment 1: influence of inbreeding on offspring production (pre-birth measures)

1. Parental characteristics

Parents were genetically more similar in sibling crosses than in unrelated crosses (W=79, p= 0.029, n=20, table 2), as expected. Other correlations between parental genetic characteristics can be found in Appendix 3. Eighteen broods were analyzed because one female from the sibling crosses died without being gravid, and another one was inseminated only on one side (see Material and Methods section). There was a nearly significant positive correlation between female size and heterozygosity (S=516.86, p=0.051, rho=0.47, n=18, figure 1).

Table 2 Parental and offspring characteristics for the 20 crosses performed in experiment 1. Female 1-S01 died without being gravid, and female 1-S04 was hemifecundated. Medians are provided with the first and third quartile

Type of cross	Cross ID	Parental genetic similarity	Female heterozygosity	Male heterozygosity	Female size (mm)	Female fecundity	Size-corrected female fecundity	Number of mancae	Proportion of mancae
Sibling	1-S01	0,34	0,64	0,27	-	-	-	-	-
	1-S02	0,68	0,45	0,45	14,53	153	10,53	139	90,85
	1-S03	0,19	0,55	0,82	14,26	164	11,5	106	64,63
	1-S04	0,56	0,64	0,64	-	-	-	-	-
	1-S05	0,41	0,64	0,45	15,64	202	12,92	159	78,71
	1-S06	-0,37	0,64	0,64	16,47	174	10,56	121	69,54
	1-S07	-0,46	0,45	0,55	14,12	186	13,17	119	63,98
	1-S08	-0,25	0,64	0,45	14,95	170	11,37	156	91,76
	1-S09	0,21	0,45	0,36	15,92	181	11,37	92	50,83
	1-S10	0,48	0,64	0,45	15,92	205	12,88	200	97,56
	1st quartile	-0,14	0,48	0,45	14,4625	168,5	11,17	115,75	64,47
	median	0,28	0,64	0,45	15,295	177,5	11,44	130	74,13
	3rd quartile	0,46	0,64	0,61	15,92	190	12,89	156,75	91,08
Non-sibling	1-NS01	-0,05	0,18	0,45	16,2	182	11,23	182	100
	1-NS02	-0,55	0,36	0,36	14,53	132	9,08	119	90,15
	1-NS03	-0,66	0,55	0,82	16,47	195	11,84	190	97,44
	1-NS04	-0,03	0,73	0,73	16,61	207	12,46	202	97,58
	1-NS05	-0,24	0,45	0,64	12,32	90	7,31	48	53,33
	1-NS06	-0,49	0,64	0,27	16,47	217	13,18	165	76,04
	1-NS07	0,11	0,82	0,55	15,25	198	12,98	158	79,8
	1-NS08	-0,19	0,55	0,64	16,2	231	14,26	179	77,49
	1-NS09	0,17	0,64	0,55	15,36	196	12,76	171	87,24
	1-NS10	-0,13	0,73	0,55	16,61	216	13	216	100
	1st quartile	-0,43	0,48	0,48	15,2775	185,25	11,39	159,75	78,07
	median	-0,16	0,59	0,55	16,2	197	12,61	175	88,7
	3rd quartile	-0,04	0,7	0,64	16,47	213,75	13	188	97,55

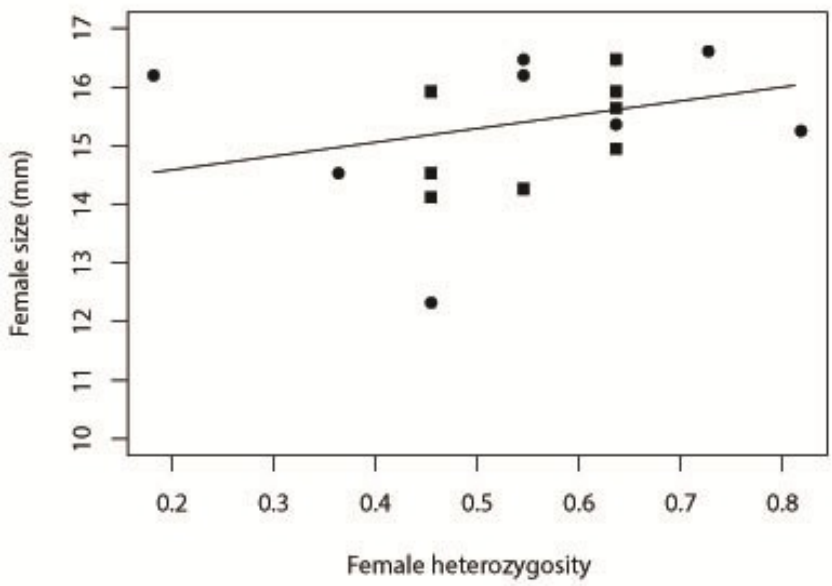

Figure 1 Female size is nearly affected by heterozygosity. Squares: sibling crosses (n=8); circles: non-sibling crosses (n=10). P=0.051, Spearman correlation test.

2. Female fecundity

Bigger females (S=304.25, p=0.002, rho=0.69, n=18, figure 2A) and more heterozygous females (S=381.65, p=0.008, rho=0.61, n=18, figure 2B) had a higher fecundity. More heterozygous females still had a higher size-corrected fecundity (S=463.79, p=0.026, rho=0.52, n=18, figure 2C). There was no effect of male heterozygosity (S=928.24, p=0.87, rho=0.04, n=18), parental genetic similarity (S=988, p=0.94, rho=-0.02, n=18) and type of cross (W=33, p=0.57, n=18) on size-corrected fecundity.

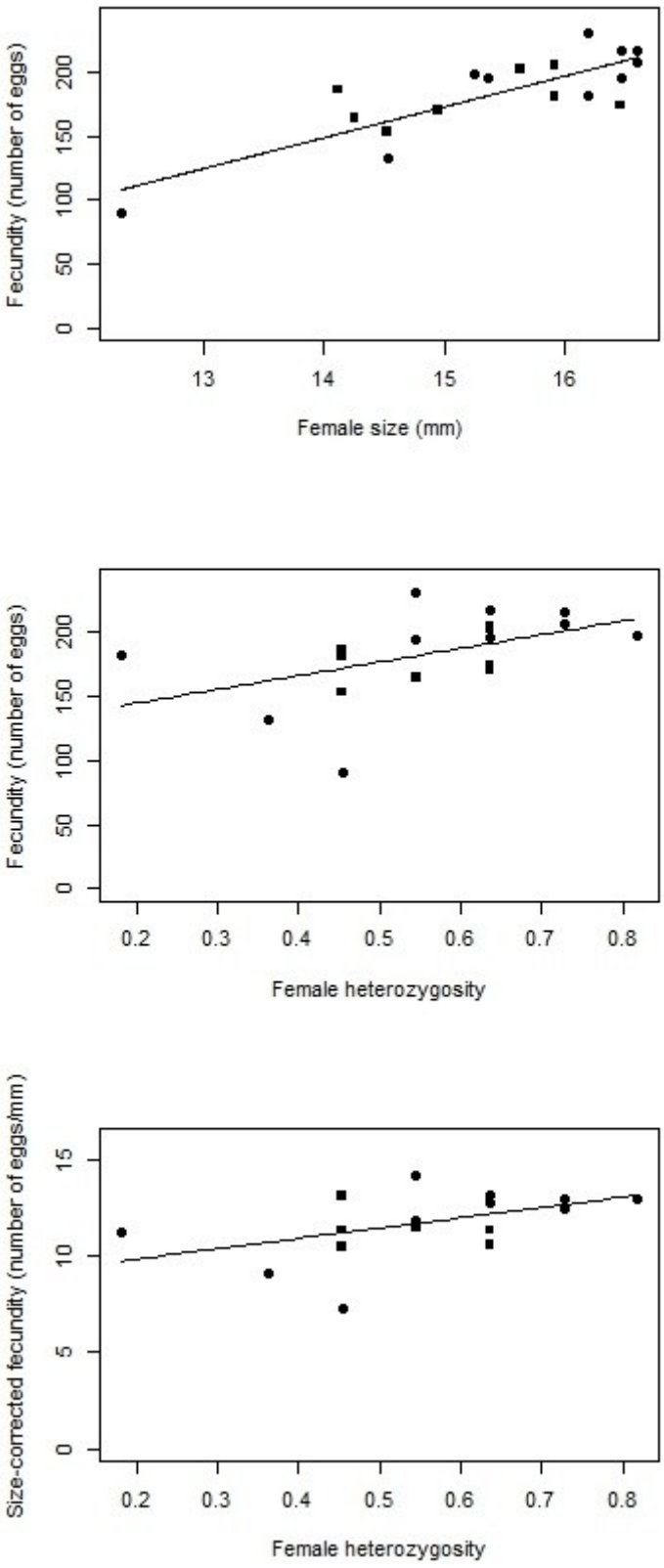

Figure 2 Female fecundity. A: fecundity as a function of female size; B: fecundity as a function of female heterozygosity; C: size-corrected fecundity as a function of heterozygosity. Squares: sibling crosses (n=8); circles: non-sibling crosses (n=10). $P<0.05$, Spearman correlation test.

3. Fertilisation of undeveloped eggs

Among 469 eggs for which DNA was extracted, genotypes have been obtained for 440 eggs. Both paternal and maternal alleles were detected in 408 eggs (92.73% of genotyped eggs), and the remaining 32 presented only maternal alleles. However, among those 32 eggs, 26 showed weak peaks when genotyping, so that the absence of paternal alleles might result from low genotyping power. Thus in a more conservative approach, eggs with paternal and maternal alleles represent 98.55% of all eggs for which scoring peaks are strong (408 out of 414). For the 6 remaining eggs with only maternal alleles detected, we cannot determine whether this is a biological result or a failure to amplify paternal DNA, so we cannot exclude that 100% of eggs are fertilised in each brood. Moreover, with so few eggs, (n=3 for sibling crosses, each egg in a different cross; and n=3 for non-sibling crosses, all eggs in the same cross), we cannot perform any statistical comparison between sibling and non-sibling crosses.

4. Embryo development

The proportion of *mancae* in the *marsupium* significantly increased with female size (S=511.87, p=0.048, rho=0.47, n=18). However, this proportion was not influenced by parental heterozygosity (female heterozygosity: S=715.75, p=0.29, rho=0.26, n=18; male heterozygosity: S=997.04, p=0.91, rho=-0.03, n=18), nor by parental genetic similarity (S=906.97, p=0.80, rho=0.06, n=18) or by the type of cross (W=25, p=0.20, n=18).

Experiment 2: influence of inbreeding on offspring quality (post-birth measures)

1. Realized parental similarity and offspring heterozygosity gradient

Parental genetic characteristics are summarized in table 3. As expected, parents were significantly more similar in sibling than in non-sibling crosses (W=90, p=0.001, n=21). However, we noted a trend for males in sibling crosses to be more heterozygous than males in non-sibling crosses (W=71.5, p =0.084), and male heterozygosity was positively correlated with parental genetic similarity

Table 3 Parental and offspring characteristics for the 21 crosses performed in experiment 2. Crosses 2-S04 and 2-S07 did not result in any brood because female 2-S04 died and female 2-S07 aborted. Medians are provided with the first and third quartile, except for *pulli* size and weight where means are given ± standard error.

Type of cross	Cross ID	Parental genetic similarity	Female heterozygosity	Male heterozygosity	Number of genotyped *pulli*	Mean observed *pulli* heterozygosity	Brood size	Number of surviving *pulli* at 6 weeks	Mean *pulli* size (mm)	Mean *pulli* weight (mg)
Sibling	2-S01	0,59	0,45	0,45	20	0,35	68	20	3,34±0,12	2,13±0,21
	2-S02	0,13	0,55	0,55	20	0,45	82	16	2,82±0,04	1,16±0,07
	2-S03	0,56	0,55	0,64	20	0,45	53	12	2,81±0,11	1,23±0,14
	2-S04	0,51	0,36	0,64	-	-	-	-	-	-
	2-S05	0,72	0,73	0,73	18	0,43	88	16	2,72±0,09	1,05±0,14
	2-S06	0,44	0,73	0,64	20	0,51	118	16	2,77±0,07	0,92±0,1
	2-S07	0,54	0,73	0,64	-	-	-	-	-	-
	1st quartile	*0,48*	*0,5*	*0,6*	*20*	*0,43*	*68*	*16*	-	-
	median	*0,54*	*0,55*	*0,64*	*20*	*0,45*	*82*	*16*	-	-
	3rd quartile	*0,58*	*0,73*	*0,64*	*20*	*0,45*	*88*	*16*	-	-
	mean	-	-	-	-	-	-	-	*2,89±0,1*	*1,3±0,18*
Non-sibling	2-NS01	0,07	0,55	0,55	19	0,44	148	20	3,07±0,04	1,58±0,06
	2-NS02	0,26	0,55	0,55	20	0,53	126	19	2,83±0,03	1,17±0,05
	2-NS03	0,33	0,82	0,64	20	0,57	70	13	2,61±0,1	0,95±0,05
	2-NS04	0,24	0,73	0,64	20	0,66	125	16	2,77±0,04	1,18±0,06
	2-NS05	-0,1	0,73	0,36	19	0,56	92	20	2,85±0,06	1,32±0,07
	2-NS06	*0,49*	*0,64*	*0,55*	*20*	*0,42*	*46*	*18*	*2,68±0,04*	*1,01±0,04*
	2-NS07	-0,04	0,45	0,45	20	0,41	120	18	2,25±0,06	0,52±0,04
	2-NS08	-0,37	0,55	0,45	20	0,65	146	15	2,47±0,05	0,6±0,05
	2-NS09	-0,1	0,73	0,64	20	0,64	101	16	-	1,32±0,28
	2-NS10	-0,16	0,82	0,45	20	0,61	107	18	2,75±0,03	1,1±0,06
	2-NS11	0,14	0,82	0,55	20	0,55	87	18	3,02±0,03	1,39±0,05
	2-NS12	0,11	0,45	0,55	20	0,42	108	19	2,47±0,04	0,76±0,05
	2-NS13	0,26	0,73	0,64	20	0,54	144	16	2,65±0,03	0,93±0,03
	2-NS14	*0,3*	*0,73*	*0,55*	*20*	*0,51*	*157*	*18*	*2,53±0,03*	*0,77±0,04*
	1st quartile	*-0,09*	*0,55*	*0,48*	*20*	*0,46*	*94,25*	*16*	-	-
	median	*0,13*	*0,73*	*0,55*	*20*	*0,55*	*114*	*18*	-	-
	3rd quartile	*0,26*	*0,73*	*0,62*	*20*	*0,6*	*139,5*	*18,75*	-	-
	mean	-	-	-	-	-	-	-	*2,69±0,06*	*1,04±0,08*

(S=651.63, p=0.006, rho=0.58, n=21). This might make analyses about male heterozygosity difficult to interpret because of the confounding effect of the type of cross and parental genetic similarity.

We obtained 19 broods out of 21 crosses because one female died and another one aborted. Both females belonged to sibling crosses. Information on the 19 resulting broods, such as brood size, six-week survival and mean heterozygosity, size and weight, is provided in table 3. Even though *pulli* from more similar parents were less heterozygous (S=1661.2, p=0.049, rho=-0.46, n=19), we only observed a trend for *pulli* from sibling crosses to be less heterozygous than *pulli* from non-sibling crosses (W=16, p=0.09, n=19). Other correlations between parental variables and offspring heterozygosity can be found in Appendix 3.

2. Life-history traits

Offspring number after birth

There was a trend for a negative effect of parental genetic similarity (S=1626, p=0.07, rho=-0.43, n=19) on offspring number at birth, and a trend for sibling crosses to have fewer *pulli* (W=14, p=0.056, n=19). There was no correlation between parental heterozygosity and offspring number (female heterozygosity: S=1202.3, p=0.82, rho=-0.05, n=19; male heterozygosity: S=1244.7, p=0.71, rho=-0.09, n=19), and no influence of *pulli* heterozygosity on offspring number (S=843.87, p=0.28, rho=0.26, n=19).

Six-week offspring survival

The number of surviving *pulli* after six weeks of growth was negatively correlated with male heterozygosity (S=1846, p=0.005, rho=-0.62, n=19) but not with female heterozygosity (S=1474.1, p=0.22, rho=-0.29, n=19). There was a trend for more heterozygous *pulli* to survive less (S=1609.2, p=0.078, rho=-0.41, n=19). Neither parental similarity nor type of cross influenced six-week survival (respectively: S= 1337.3, p=0.50, rho=-0.17, n=19; W=23.5, p=0.30, n=19).

Offspring size and weight

Out of the 323 *pulli* which survived until six weeks, 220 were not in moulting period, among which 216 could be sized and 219 could be weighted. Due to an issue with the binocular magnifier, we were not able to size *pulli* from one brood (identified 2-NS09 in table 3). Offspring size was not influenced by parental heterozygosity (female heterozygosity: β=0.09±0.51, p=0.86; male heterozygosity: β=-0.19±0.74, p=0.81, n=214) nor by parental genetic similarity (β=0.29±0.21, p=0.18, n=214), *pulli* heterozygosity (β=-0.59±0.70, p=0.41, n=214) or the type of cross ($F_{1,16.44}$=2.75, p=0.12, n=214). Similarly, there was no influence of parental heterozygosity on offspring weight (female heterozygosity: β=-3.64x10^{-2}±0.746, p=0.96; male heterozygosity: β=-0.361 ±1.06, p=0.74, n=219), nor influence of parental genetic similarity (β=0.373±0.302, p=0.23, n=219), *pulli* heterozygosity (β=-0.897±0.954, p=0.36, n=219) or the type of cross ($F_{1,17.37}$=1.93, p=0.18, n=219).

Comparison between experiment 1 and 2: insights on offspring birth

As expected, the number of *mancae* shortly before the end of incubation (expected to be viable at birth) in experiment 1 was significantly higher than the number of *pulli* right after birth in experiment 2, for both types of cross (sibling crosses: W = 38, p = 0.006, n=13; non-sibling crosses: W = 120, p = 0.002, n=24, Figure 3).

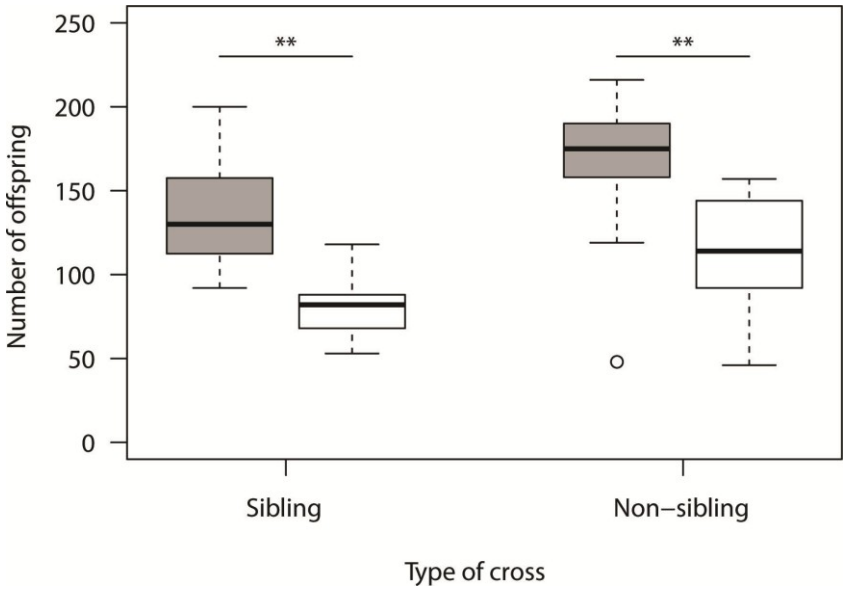

Figure 3 Comparison of the number of offspring before and after birth. Light grey: number of *mancae* in experiment 1 (n=8 for sibling, n=10 for non-sibling crosses); white: number of *pulli* in experiment 2 (n=5 for sibling, n=14 for non-sibling crosses). **: significant difference ($p<0.01$), Mann-Whitney tests.

Discussion

In this study, we investigated whether inbreeding and parental heterozygosity might affect offspring production and quality in *A. vulgare*. We observed a higher fecundity of heterozygous females, which also tended to be bigger. There was no difference in fecundity between inbred and non-inbred crosses, and the majority of eggs were fertilised in all crosses. There was no significant effect of inbreeding on the proportion of embryos having reached the *manca* stage at the end of incubation. Offspring survival, size and weight at six week did not depend on whether crosses are inbred or not, but the number of *pulli* collected right after birth was lower than the number of *mancae* at the end of incubation.

Before discussing these results, some limitations of this study must be taken into account. The first limitation is the low sample size. Analyses realized on small samples might suffer from low power, and with around 20 replicates in our experiments, we might sometimes have failed to detect an effect. This is even more likely that small effect sizes are very common in HFC studies (Chapman et al., 2009) and decrease power even more. Moreover, g_2 did not differ significantly from zero, which

could either mean that our set of markers was not large enough, or that there was not enough variance in inbreeding to obtain significant ID. However, g_2 was positive and nearly significant, and HFC can still arise without g_2 being significant when there is low variance in inbreeding (Szulkin et al., 2010), meaning that observing HFC could be possible under such g_2 conditions.

Two correlations implying male heterozygosity were unexpected in experiment 2. First, more heterozygous males were more similar to their partner. Correlations between heterozygosity and genetic similarity are generally negative, if ever present (Roberts, Hale, & Petrie, 2006). Moreover, we did not detect such correlation in experiment 1 or for female heterozygosity in experiment 2, nor in other studies on this species with the same molecular markers (Durand et al., 2015, 2017). As such, the correlation between male heterozygosity and parental genetic similarity is very unlikely to reflect any biological relationship, and might result from the assignation by coincidence of heterozygous males to more similar partners in experiment 2. A second unexpected result is the fact that offspring of more heterozygous males survived less well, as well as the trend for more heterozygous pulli to survive less well, which is quite counter intuitive because the reverse effect can be expected (Annavi et al., 2014). Some studies report similar cases where inbred individuals perform better than outbred ones. This is the result of outbreeding depression (Charlesworth & Willis, 2009; Lynch, 1991), where different lineages or populations evolve independently, and are then crossed. This leads to the breakdown of coevolved gene complexes when the lineages are mixed, resulting in lower fitness for heterozygous hybrid individuals. However, outbreeding depression is unlikely in our case because our study is performed on a lab lineage which is genetically homogenous. A more plausible explanation is confounding effects due to the unexpected correlation between male heterozygosity and parental genetic similarity within crosses, so that a biological relationship between heterozygosity and offspring survival is unlikely in our case.

No life history trait in offspring seems to be affected by inbreeding in *A. vulgare* offspring. Apart from the limitations previously discussed, a possibility is that specific conditions are required for HFC to arise: inbreeding effects might appear later in life as in birds (Avilés & Bukowski, 2006; Bebbington et al., 2016) or in fish (Langen, Bakker, Baldauf, Shrestha, & Thuenken, 2017), especially

considering offspring size since we showed that more heterozygous females tend to be bigger. Additionally, more and more studies suggest that HFC are more likely to arise under harsh environmental conditions (Annavi et al., 2014; Da Silva, Luikart, Yoccoz, Cohas, & Allaine, 2006; Fox & Reed, 2011). Resource limitation, biotic or abiotic stress might then be required for *A. vulgare* offspring to present HFC.

We observed a trend for more similar parents to produce fewer *pulli*, which might be due to a lower sample size compared to previous work where this effect was significant (Durand et al., 2017). One aim of the present study was to determine the mechanisms responsible for such effect. Here we showed that female fecundity did not differ between inbred and non-inbred crosses, nor did egg fertilisation (since nearly all eggs were fertilised) or *mancae* proportion in the *marsupium*. Besides, the number of *pulli* counted 24h after birth was significantly lower than the number of *mancae* at the end of incubation for both sibling and non-sibling crosses, which suggests the existence of stillborn *mancae* or mortality events around birth. We can then postulate that such events might occur more in inbred crosses and impact brood size.

Bigger females had a higher fecundity, a correlation which is well known in terrestrial isopods (Lawlor, 1976; Sutton et al., 1984), but the fact that they present a higher proportion of *mancae* in the *marsupium* had never been described. Such females might possess greater energy reserves and could invest more in offspring during vitellogenesis for example, leading to a better development. Very interestingly, female size was close to be affected by heterozygosity, and more heterozygous females had a higher fecundity even when controlling for their size. This relationship has been observed in vertebrate species (Heath et al., 2002; White et al., 2015), and inbred females lay fewer eggs in some arthropods (Radwan, 2003; Reed, Nicholas, & Stratton, 2007), sometimes only for their second clutch (Meunier & Kölliker, 2013). This suggests that more heterozygous females possess a better reproductive potential. Despite this, both in the present study or in previous work, those females did not produce more *pulli* (Durand et al., 2017): stronger mechanisms acting between the end of incubation and *pulli* collection after birth might be masking the effect of female heterozygosity. It is then very possible that parental genetic similarity overwhelms the effect of female heterozygosity

through the mechanisms previously evoked (differential mortality at birth between inbred and non-inbred crosses).

This study provided insights on the relationship between fitness traits and genetic characteristics in *A. vulgare*. An evaluation of long-term fitness would now be relevant, as short-term deleterious effects of inbreeding for one breeding event are not mandatorily associated with a decrease in lifetime reproductive success (Van de Casteele, Galbusera, Schenck, & Matthysen, 2003). Lifetime reproductive success should also be estimated for heterozygous females in more natural settings: mating strategies such as mate choice or multiple mating (Valette, Durand, Bech, Grandjean, & Beltran-Bech, 2017) might allow females to avoid or compensate for developmental failure or mortality due to inbreeding, so higher fecundity might result in higher fertility.

Acknowledgements

We thank Alexandra Laffite, Solène Blanchard and Daniel Guyonnet for technical assistance, Charlotte Depeux for valuable discussions, and two anonymous reviewers for their advices. Doctoral researches of S. Durand were funded by the Région Nouvelle-Aquitaine, previously Région Poitou-Charentes. The funding is partly granted by the following 2015‑2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER). This work was supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

Agresti, A. (2002). *Categorical Data Analysis*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/0471249688

Annavi, G., Newman, C., Buesching, C. D., Macdonald, D. W., Burke, T., & Dugdale, H. L. (2014). Heterozygosity-fitness correlations in a wild mammal population: accounting for parental and environmental effects. *Ecology and Evolution*, *4*(12), 2594–2609. https://doi.org/10.1002/ece3.1112

Appel, C., Quadros, A. F., & Araujo, P. B. (2011). Marsupial extension in terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Nauplius*, *19*, 123–128.

Avilés, L., & Bukowski, T. C. (2006). Group living and inbreeding depression in a subsocial spider. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *273*(1583), 157–163. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3308

Balloux, F., Amos, W., & Coulson, T. (2004). Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Molecular Ecology*, *13*(10), 3021–3031. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02318.x

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *R Package Version 1.1-7. Http://Cran.r-Project.Org/Package=lme4*. Retrieved from http://CRAN.R-project.org/package=lme4

Bebbington, K., Spurgin, L. G., Fairfield, E. A., Dugdale, H. L., Komdeur, J., Burke, T., & Richardson, D. S. (2016). Telomere length reveals cumulative individual and transgenerational inbreeding effects in a passerine bird. *Molecular Ecology*, *25*(12), 2949–2960. https://doi.org/10.1111/mec.13670

Beltran, S., Cezilly, F., & Boissier, J. (2008). Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in Schistosomes. *Plos One*, *3*(10), e3328. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003328

Bierne, N., Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., & Bédier, E. (2000). Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, *184*(3), 203–219. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00331-2

Bilde, T., Maklakov, A. A., & Schilling, N. (2007). Inbreeding avoidance in spiders: evidence for rescue effect in fecundity of female spiders with outbreeding opportunity. *Journal of Evolutionary Biology*, *20*(3), 1237–1242. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01280.x

Carvalho, G. B., Ja, W. W., & Benzer, S. (2009). Non-lethal genotyping of single *Drosophila*. *BioTechniques*, *46*(4), 312–314. https://doi.org/10.2144/000113088

Chapman, J. R., Nakagawa, S., Coltman, D. W., Slate, J., & Sheldon, B. C. (2009). A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology*, *18*(13), 2746–2765. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04247.x

Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). Fundamental concepts in genetics: the genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, *10*(11), 783–796. https://doi.org/10.1038/nrg2664

Coulon, A. (2010). genhet: an easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. *Molecular Ecology Resources*, *10*(1), 167–169. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02731.x

Da Silva, A., Luikart, G., Yoccoz, N. G., Cohas, A., & Allaine, D. (2006). Genetic diversity-fitness correlation revealed by microsatellite analyses in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Conservation Genetics*, *7*(3), 371–382. https://doi.org/10.1007/s10592-005-9048-y

David, P. (1998). Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity*, *80*, 531–537. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00393.x

David, P., Pujol, B., Viard, F., Castella, V., & Goudet, J. (2007). Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, *16*(12), 2474–2487. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03330.x

Diehl, W., & Biesiot, P. (1994). Relationships between multilocus heterozygosity and morphometric indexes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *182*(2), 237–250. https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90054-X

Durand, S., Beauché, F., Richard, F.-J., & Beltran-Bech, S. (2015). How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*? *Ethology*, *121*(11), 1122–1130. https://doi.org/10.1111/eth.12429

Durand, S., Cohas, A., Braquart-Varnier, C., & Beltran-Bech, S. (2017). Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(6), 90. https://doi.org/10.1007/s00265-017-2317-1

Duthie, A. B., Lee, A. M., & Reid, J. M. (2016). Inbreeding parents should invest more resources in fewer offspring. *Proc. R. Soc. B*, *283*(1843), 20161845. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1845

Eberhard, W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton: Princeton University Press.

Firman, R. C., Gasparini, C., Manier, M. K., & Pizzari, T. (2017). Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends in Ecology & Evolution*, *32*(5), 368–382. https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.02.010

Firman, R. C., & Simmons, L. W. (2015). Gametic interactions promote inbreeding avoidance in house mice. *Ecology Letters*, *18*(9), 937–943. https://doi.org/10.1111/ele.12471

Fitzpatrick, J. L., & Evans, J. P. (2014). Postcopulatory inbreeding avoidance in guppies. *Journal of Evolutionary Biology*, *27*(12), 2585–2594. https://doi.org/10.1111/jeb.12545

Fox, C. W., & Reed, D. H. (2011). Inbreeding depression increases with environmental stress: an experimental study and meta-analysis. *Evolution*, *65*(1), 246–258. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01108.x

Giraud, I., Valette, V., Bech, N., Grandjean, F., & Cordaux, R. (2013). Isolation and characterization of microsatellite loci for the Isopod Crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in Terrestrial Isopods. *Plos One*, *8*(10), e76639. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076639

Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, *86*(6), 485–486.

Hansson, B., & Westerberg, L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, *11*(12), 2467–2474. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01644.x

Hardy, O. J., & Vekemans, X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, *2*(4), 618–620. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x

Heath, D. D., Bryden, C. A., Shrimpton, J. M., Iwama, G. K., Kelly, J., & Heath, J. W. (2002). Relationships between heterozygosity, allelic distance (d^2), and reproductive traits in chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *59*(1), 77–84. https://doi.org/10.1139/f01-192

Houle, D., Morikawa, B., & Lynch, M. (1996). Comparing mutational variabilities. *Genetics*, *143*(3), 1467–1483.

Jin, K., Ho, H. N., Speed, T. P., & Gill, T. J. (1995). Reproductive failure and the Major Histocompatibility Complex. *American Journal of Human Genetics*, *56*(6), 1456–1467.

Kaunisto, K. M., Viitaniemi, H. M., Leder, E. H., & Suhonen, J. (2013). Association between host's genetic diversity and parasite burden in damselflies. *Journal of Evolutionary Biology*, *26*(8), 1784–1789. https://doi.org/10.1111/jeb.12177

Keller, L. F., & Waller, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(5), 230–241. https://doi.org/10.1016/s0169-5347(02)02489-8

Kempenaers, B. (2007). Mate choice and genetic quality: A review of the heterozygosity theory. In H. J. Brockmann, T. J. Roper, M. Naguib, K. E. WynneEdwards, C. Barnard, & J. Mitani (Eds.), *Advances in the Study of Behavior, Vol 37* (Vol. 37, pp. 189–278). San Diego: Elsevier Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/s0065-3454(07)37005-8

Langen, K., Bakker, T. C. M., Baldauf, S. A., Shrestha, J., & Thuenken, T. (2017). Effects of ageing and inbreeding on the reproductive traits in a cichlid fish I: the male perspective. *Biological Journal of the Linnean Society*, *120*(4), 752–761.

Lawlor, L. R. (1976). Molting, growth and reproductive strategies in terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *Ecology*, *57*(6), 1179–1194. https://doi.org/10.2307/1935043

Lefebvre, F. (2002). *Stratégies de reproduction chez les crustacés isopodes terrestres* (PhD dissertation). Université de Poitiers, Poitiers.

Lehmann, L., Keller, L. F., & Kokko, H. (2007). Mate choice evolution, dominance effects, and the maintenance of genetic variation. *Journal of Theoretical Biology*, *244*(2), 282–295. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.07.033

Lewis, Z., & Wedell, N. (2009). Male moths reduce sperm investment in relatives. *Animal Behaviour*, *77*(6), 1547–1550. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.03.013

Lihoreau, M., Zimmer, C., & Rivault, C. (2008). Mutual mate choice: when it pays both sexes to avoid inbreeding. *Plos One*, *3*(10), e3365. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003365

Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, *45*(3), 622–629. https://doi.org/10.2307/2409915

McCune, A. R., Fuller, R. C., Aquilina, A. A., Dawley, R. M., Fadool, J. M., Houle, D., Kondrashov, A. S. (2002). A low genomic number of recessive lethals in natural populations of bluefin killifish and zebrafish. *Science*, *296*(5577), 2398–2401. https://doi.org/10.1126/science.1071757

McElroy, T. C., Presley, M. L., & Diehl, W. J. (1999). Genotypes of multiple allozyme loci interact with an experimental environment to affect survivorship in earthworms (*Eisenia andrei*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology*, *123*(3), 241–247. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00053-7

Meunier, J., & Kölliker, M. (2013). Inbreeding depression in an insect with maternal care: influences of family interactions, life stage and offspring sex. *Journal of Evolutionary Biology*, *26*(10), 2209–2220. https://doi.org/10.1111/jeb.12217

Moreau, J., Bertin, A., Caubet, Y., & Rigaud, T. (2001). Sexual selection in an Isopod with *Wolbachia*-induced sex reversal: males prefer real females. *Journal of Evolutionary Biology*, *14*(3), 388–394. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00292.x

Moreau, J., & Rigaud, T. (2002). The shape of calcium carbonate deposits as an external marker for female reproductive status in terrestrial isopods. *Journal of Crustacean Biology*, *22*(2), 353–356.

Müller, T., & Müller, C. (2016). Consequences of mating with siblings and nonsiblings on the reproductive success in a leaf beetle. *Ecology and Evolution*, *6*(10), 3185–3197. https://doi.org/10.1002/ece3.2103

Pitnick, S. (1991). Male size influences mate fecundity and remating interval in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, *41*, 735–745. https://doi.org/10.1016/s0003-3472(05)80340-9

R Development Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Http://Www.R-Project.Org/*. Retrieved from http://www.R-project.org/

Radwan, J. (2003). Inbreeding depression in fecundity and inbred line extinction in the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*. *Heredity*, *90*(5), 371–376. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800254

Reed, D. H., Nicholas, A. C., & Stratton, G. E. (2007). Inbreeding levels and prey abundance interact to determine fecundity in natural populations of two species of wolf spider. *Conservation Genetics*, *8*(5), 1061–1071. https://doi.org/10.1007/s10592-006-9260-4

Roberts, S. C., Hale, M. L., & Petrie, M. (2006). Correlations between heterozygosity and measures of genetic similarity: implications for understanding mate choice. *Journal of Evolutionary Biology*, *19*(2), 558–569. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.01003.x

Rondeau, A., & Sainte-Marie, B. (2001). Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin*, *201*(2), 204–217. https://doi.org/10.2307/1543335

Singh, S., & Zouros, E. (1978). Genetic variation associated with growth rate in american oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*, *32*(2), 342–353. https://doi.org/10.2307/2407602

Singmann, H., Bolker, B., Westfall, J., Aust, F., Højsgaard, S., Fox, J., … Mertens, U. (2016). afex: Analysis of Factorial Experiments. *R Package v0.16-1. Https://Github.Com/Singmann/Afex*.

Stoffel, M. A., Esser, M., Kardos, M., Humble, E., Nichols, H., David, P., & Hoffman, J. I. (2016). inbreedR: an R package for the analysis of inbreeding based on genetic markers. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*(11), 1331–1339. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12588

Surbida, K. L., & Wright, J. C. (2001). Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda : Oniscidea). *Physiological and Biochemical Zoology*, *74*(6), 894–906. https://doi.org/10.1086/324474

Sutton, S. L., Hassal, M., Willows, R., David, R. C., Grundy, A., & Sunderland, K. D. (1984). Life histories of terrestrial isopods: a study of intra- and interspecific variation. In S. L. Sutton & D. M. Holdich (Eds.), *The biology of terrestrial isopods* (pp. 269–294). Oxford: Clarendon Press.

Szulkin, M., Bierne, N., & David, P. (2010). Heterozygosity-Fitness Correlations: a time for reappraisal. *Evolution*, *64*(5), 1202–1217. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00966.x

Thornhill, R. (1983). Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *American Naturalist*, *122*(6), 765–788. https://doi.org/10.1086/284170

Tregenza, T., & Wedell, N. (2000). Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review. *Molecular Ecology*, *9*(8), 1013–1027. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00964.x

Valette, V., Durand, S., Bech, N., Grandjean, F., & Beltran-Bech, S. (2017). Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*? *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(2), 235–243. https://doi.org/10.1111/jeb.13009

Valimaki, K., Hinten, G., & Hanski, I. (2007). Inbreeding and competitive ability in the common shrew (*Sorex araneus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *61*(7), 997–1005. https://doi.org/10.1007/s00265-006-0332-8

Van de Casteele, T., Galbusera, P., Schenck, T., & Matthysen, E. (2003). Seasonal and lifetime reproductive consequences of inbreeding in the great tit *Parus major*. *Behavioral Ecology*, *14*(2), 165–174. https://doi.org/10.1093/beheco/14.2.165

Velando, A., Barros, A., & Moran, P. (2015). Heterozygosity-fitness correlations in a declining seabird population. *Molecular Ecology*, *24*(5), 1007–1018. https://doi.org/10.1111/mec.13092

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. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01220.x

Wang, J. L. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, *160*(3), 1203–1215.

Wedell, N., Gage, M. J. G., & Parker, G. A. (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(7), 313–320. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02533-8

White, K. L., Eason, D. K., Jamieson, I. G., & Robertson, B. C. (2015). Evidence of inbreeding depression in the critically endangered parrot, the kakapo. *Animal Conservation*, *18*(4), 341–347. https://doi.org/10.1111/acv.12177

Whitehorn, P. R., Tinsley, M. C., Brown, M. J. F., Darvill, B., & Goulson, D. (2011). Genetic diversity, parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, *278*(1709), 1195–1202. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1550

Appendix 1 Gathering two types of cross for experiment 2 (post-birth measures)

There was a significant difference in genetic similarity across the three types of crosses primarily determined for experiment 2 (Kruskal-Wallis χ^2= 10.026, df = 2, p-value = 0.007, Figure A1a), with a significant difference between sibling and cousin crosses and between sibling and unrelated crosses, but not between cousin and unrelated crosses (Dunn test*, respectively p=0.025, p=0.003 and p=0.21). Hence we chose to gather cousin and unrelated crosses into the single category non-sibling, in which genetic similarity was significantly different from sibling crosses (Mann-Whitney W = 90, p-value = 0.001, Figure A1b).

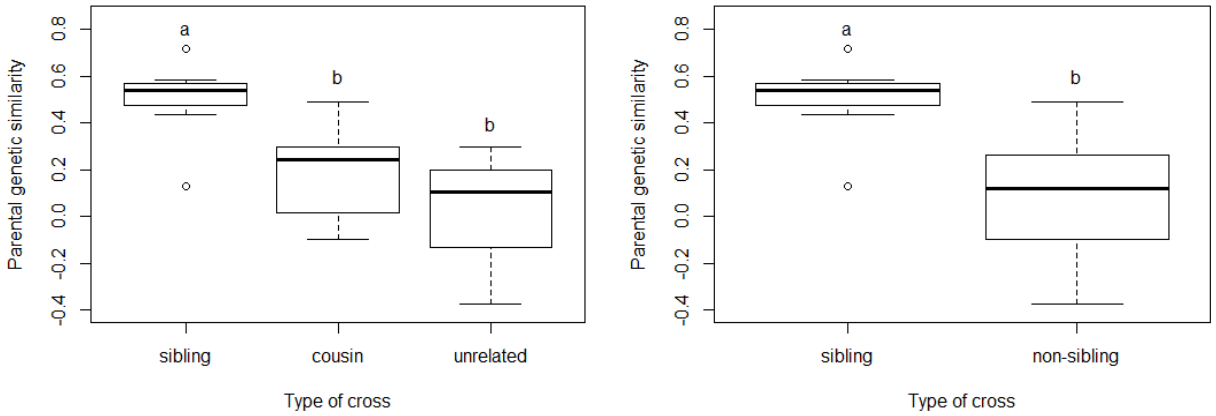

Figure A1: parental genetic similarity according to the different types of crosses in experiment 2. a) three types of crosses, b) two types of crosses after gathering cousin and unrelated crosses into non-sibling crosses.

*Post-hoc Dunn test was performed with the function "dunn.test" from the package "dunn.test" (Dinno, 2016).

Dinno, A. (2016). Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. *R Package Version 1.3.2 https://Cran.r-Project.Org/Package=dunn.Test*.

Appendix 2 Microsatellite amplification

We used microsatellites for which primers have been designed byVerne et al. (2006) and Giraud, Valette, Bech, Grandjean, and Cordaux (2013) (Table A2). We used the Qiagen Multiplex PCR kit to perform PCR. For each sample, 1µL of DNA was added to 5µL of Qiagen KM master mix provided by the kit, 1µL of primer mix containing primers according to each multiplex (2µM of each primer, 10mM Tris-HCl and 1mM EDTA) and 3µL of RNase-free water. Amplifications were performed with a Bio-Rad thermocycler with the following program: 15 min at 95°C, then 30 cycles of 30s at 94°C, 90s at 57°C and 60s at 72°C, and a final step of 30 min at 60°C.

Table A2: Microsatellites markers and primers used in our study.

Locus	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Multiplex	Dye	Size range (bp)
Av1*	DQ234304	F: TGGAGTCAACTCACATTCTG R: TGTCTGTAAAACTTGTGCTACG	1	6-FAM	107-115
Av2*	DQ234305	F: TGAAGTTCGGGTGAATTGTG R: ATACCATGACGTGTCGCAAG	1	6-FAM	156-164
Av4*	DQ234307	F: CCGAACCTTTCGAAGGTATT R: AAGGCACATAACATTTTCACAAA	1	6-FAM	188-246
Av5*	DQ234308	F: CGTGCGAAGTTCAGATTCTTT R: GCGCGCTCGAGGATTTAC	1	6-FAM	261-309
Av9*	DQ234312	F: TCTCGAAGAATTGCCTCACA R: CGATGACTGGGACAATCTCA	1	HEX	196-202
Av6*	DQ234309	F: GGAATGAGGTCGTCGACTATG R: GTCTTTCAAACGGGCACAAT	2	6-FAM	169-175
Av3*	DQ234306	F: TGAGTCTCATTATAGTTTGGATGA R: TCCTCTCTATACCCCATAATTTCA	2	6-FAM	190-226
Av56†	10.5061/dryad.md545	F: TTCAAAGGAGCGTTTGACCT R: AACCACAGCAACAACAGCAG	3	6-FAM	203-224
Av18†	10.5061/dryad.md545	F: GAAGAAATTCAAACTTCACCATC R: CTTTGAACAGACTTACGAATAACATC	3	HEX	100-124
Av32†	10.5061/dryad.md545	F: TTTCAACCTTCCTAACCAAACC R: TTGTTTTATATCCACGACCATCC	3	NED	87-113
Av63†	10.5061/dryad.md545	F: CAAAACATCTGTACGGATTCCC R: GCCAAACATAAATGCTCGCT	3	NED	133-145

* Verne et al. (2006), † Giraud et al. (2013)

Appendix 3 Correlations between parental and offspring genetic characteristics for experiments 1 and 2

Table A3: Correlations and comparisons of parental and offspring genetic characteristics within each experiment. Above diagonal: p-values; under diagonal: whether rho value for Spearman correlation tests between two continuous variables, or direction of the difference when comparing sibling (S) and non-sibling (NS) crosses with Mann-Whitney tests. A) values for experiment 1 (pre-birth fitness), n=20 for all tests; B) values for experiment 2 (post-birth fitness), n=19 for tests involving observed *pulli* heterozygosity; n=21 otherwise.

A)

	Female size	**Female heterozygosity**	**Male heterozygosity**	**Parental genetic similarity**	**Type of cross**
Female size	-	0.051	0.74	0.6	0.18
Female heterozygosity	0.47	-	0.56	0.43	0.88
Male heterozygosity	0.08	0.14	-	0.57	0.47
Parental genetic similarity	-0.13	0.19	-0.13	-	0.029
Type of cross	S<NS	S>NS	S<NS	S<NS	-

B)

	Female heterozygosity	**Male heterozygosity**	**Parental genetic similarity**	**Type of cross**	**Observed *pulli* heterozygosity**
Female heterozygosity	-	0.3	0.69	0.25	0.003
Male heterozygosity	-0.41	-	0.006	0.08	0.59
Parental genetic similarity	-0.09	0.58	-	0.001	0.049
Type of cross	S<NS	S>NS	S>NS	-	0.09
Observed *pulli* heterozygosity	0.65	0.13	-0.46	S<NS	-

C.Hétérozygotie et immunocompétence

I. Introduction

Parmi la diversité des traits phénotypiques qui ont fait l'objet de recherches pour des corrélations avec la diversité génétique, l'immunité a reçu une attention certaine (Sorci *et al.*, 1997; Carissan-Lloyd *et al.*, 2004; Fossøy *et al.*, 2009). Les individus les plus hétérozygotes pour des marqueurs neutres présentent souvent des taux de parasitisme plus faibles, tel qu'il est couramment observé chez des vertébrés comme les mammifères (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2006; Luikart *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2017), les squamates (Shaner *et al.*, 2013) ou les oiseaux (MacDougall-Shackleton *et al.*, 2005). Il a également été observé chez ces derniers que les plus hétérozygotes présentent parfois des symptômes moins sévères lors d'une infection (Hawley *et al.*, 2005), ou bien une réponse immunitaire cellulaire plus importante (Hawley *et al.*, 2005; Fossøy *et al.*, 2009). Si la littérature est moins abondante chez les invertébrés, on notera tout de même quelques exemples d'insectes pour lesquels les plus hétérozygotes présentent une charge parasitaire moins importante en milieu naturel : c'est le cas du bourdon *Bombus muscorum* (Whitehorn *et al.*, 2011) ou de la demoiselle *Calopteryx splendens* (Kaunisto *et al.*, 2013). Les travaux sont plus nombreux à l'échelle populationnelle, notamment chez les insectes sociaux. Ainsi, des colonies moins diversifiées sont plus susceptibles aux infections chez le bourdon *Bombus muscorum* (Baer & Schmid-Hempel, 1999), l'abeille domestique *Apis mellifera* (Tarpy & Seeley, 2006) ou le termite *Zootermopsis angusticollis* (Calleri *et al.*, 2006). Une étude récente chez le cnidaire *Gorgonia ventalin,* indique que les plus hétérozygotes survivent mieux à une infection fongique (Andras, 2017). Ces observations pourraient s'expliquer par le fait qu'une grande diversité génétique est susceptible d'entrainer une plus grande diversité de molécules immunitaires, accroissant ainsi le panel de pathogènes que l'organisme peut reconnaitre et contre lesquels il peut mettre en place une réponse adaptée.

La diversité génétique est en effet un élément clé dans le contexte de la « course aux armements » entre hôte et parasite, d'après la théorie bien connue de la Reine Rouge (Van Valen, 1973; Muraille, 2014). Les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) présent chez les vertébrés en sont un excellent exemple abondamment documenté. Ces glycoprotéines ont pour rôle

de présenter les antigènes du soi et du non-soi aux cellules T et leurs gènes constituent les *loci* les plus polymorphes décrits chez les mammifères (Hedrick, 2002). Ainsi, des souris infectées expérimentalement par des souches avirulentes de *Salmonella enterica* survivent mieux et ont une masse plus importante si elles sont hétérozygotes pour des loci du CMH (Penn *et al.*, 2002). De même, chez des poulets élevés en milieu semi-naturel, les plus hétérozygotes pour des loci du CMH survivent plus longtemps face à une infection par le pathogène *Eimeria* spp. responsable de la coccidiose (Worley *et al.*, 2010). Cet effet est cependant indépendant de l'hétérozygotie pour des marqueurs microsatellites. Dans les deux cas présentés ici, la valeur sélective des hétérozygotes ne dépasse jamais celle des homozygotes, suggérant qu'il s'agit là d'un effet de dominance dû à un allèle avantageux, et non d'un avantage hétérozygote. Bien évidemment, un effet direct de l'hétérozygotie pour des marqueurs CMH sur la valeur sélective peut être envisagé dans ce cas de figure puisqu'il s'agit de marqueurs fonctionnels, contrairement aux marqueurs microsatellites.

Les invertébrés ne sont pas en reste concernant la diversité intraspécifique des molécules immunitaires (Ghosh *et al.*, 2011; Cerenius & Soderhall, 2013). En effet, de très nombreuses isoformes de molécules impliquées dans la lutte contre les pathogènes ont été décrites. Si cette diversité résulte principalement de la présence de familles multigéniques, d'épissage alternatif (Ng *et al.*, 2015) ou de modifications des protéines pendant ou après la traduction (Ghosh *et al.*, 2011), la variabilité nucléotidique interindividuelle peut aussi être impliquée. L'un des exemples les plus marquants et mieux documentés concerne l'escargot *Biomphalaria glabrata.* Ce mollusque d'eau douce est un hôte intermédiaire du trématode *Schistosoma mansoni*, responsable de la bilharziose (Pearce & MacDonald, 2002). Le dialogue immunitaire entre le mollusque et le trématode est médié par les Fibrinogen Related Proteins (FREPs). Ces FREPs sont répartis en 14 familles de gènes comportant chacune 1 à 9 loci chez *B. glabrata* (Ghosh *et al.*, 2011), et certaines séquences présentent une importante variabilité allélique : dans une étude de 2004, deux escargots possédaient respectivement 45 et 37 séquences uniques pour la famille FREP3, parmi lesquelles une seule était commune entre les deux individus (Zhang *et al.*, 2004). Ces molécules ont également été détectées chez le moustique *Anopheles gambiae*, chez qui 57 gènes FREPs ont été recensés (Dong &

Dimopoulos, 2009), ainsi que chez la limule *Tachypleus tridentatus* (Gokudan *et al.*, 1999) et la drosophile *Drosophila melanogaster* (Middha & Wang, 2008). Les peptides anti-microbiens (PAMs) sont un autre type de molécules immunitaires impliqué dans la lutte spécifique contre des pathogènes, et pouvant présenter de la variabilité interindividuelle au niveau nucléotidique. Par exemple, les crustines sont un type de PAMs initialement caractérisés chez les crabes (Relf *et al.*, 1999), mais présents chez une cinquantaine de crustacés (Ghosh *et al.*, 2011). Des SNP ont été détectés au sein de séquences de crustines chez le crabe *Carcinus maenas*, potentiellement à l'origine d'isoformes différentes de la protéine (Brockton *et al.*, 2007). Quoi qu'il en soit, aucune étude menée chez les invertébrés n'a utilisé les séquences variables de molécules immunitaires en tant que marqueurs génétiques pour tester l'effet de l'hétérozygotie sur la fitness, comme c'est le cas avec les molécules du CMH chez les vertébrés.

En ce qui concerne le cloporte, aucun marqueur génétique de l'immunité présentant une variabilité interindividuelle n'a été développé à ce jour. Chez *A. vulgare*, trois crustines ont été détectées par une approche transcriptomique (Chevalier *et al.*, 2012), ainsi que deux variants de l'armadillidine, seul peptide antimicrobien caractérisé chez un isopode terrestre (Verdon *et al.*, 2016). On ignore cependant si ces séquences présentent une variabilité génétique, encore moins entre individus. Toutefois, une étude transcriptomique souligne l'existence de nombreux variants parmi des transcrits liés à l'immunité : parmi 3 060 transcrits, on peut trouver jusqu'à 4 326 SNP au sein d'un individu donné (Noël, 2014). Là encore, il est possible qu'une partie de ces variations ribonucléiques découle de polymorphismes dans la séquence d'ADN. De surcroît, une corrélation intéressante impliquant la diversité génétique neutre et un paramètre immunitaire cellulaire a été suggérée par une étude pilote portant sur une quarantaine de femelles *A. vulgare* asymbiotiques (Quevarec, 2013). Dans cette étude pilote, les individus les plus hétérozygotes présentaient une densité hémocytaire (taux d'hémocytes circulants) plus faible, les hémocytes jouant un rôle crucial dans l'immunité chez les crustacés (**encadré 4**). Cette corrélation négative, à première vue surprenante étant donné l'effet généralement positif de l'hétérozygotie sur le phénotype, traduit l'une des difficultés à travailler sur des traits phénotypiques pour estimer la valeur sélective. En effet, il est difficile de donner un « sens »

Encadré 4 : Les hémocytes chez A. vulgare*, pierre angulaire du système immunitaire*

Chez *A. vulgare*, comme chez tous les crustacés, le système immunitaire repose sur l'action des effecteurs cellulaires que sont les hémocytes. Il en existe trois types (Chevalier *et al.*, 2011) : (i) les hémocytes hyalins, dont le cytoplasme est dépourvu de granules (**Figure E4.1A**) ; (ii) les hémocytes semi-granulaires dont le cytoplasme contient des granules de petite et moyenne taille (**Figure E4.**1**B**) ; et (iii) les hémocytes granulaires qui contiennent des granules de grande taille (**Figure E4.1C**). Les hémocytes sont produits en continu par les organes hématopoïétiques, au nombre de six chez les isopodes terrestres et situés dorsalement de part et d'autre du vaisseau dorsal (Chevalier et al., 2011). Après détection d'agents du non-soi, deux types de réponses immunitaires peuvent être mises en place chez les crustacés, à savoir les réponses cellulaires et les réponses humorales (Jiravanichpaisal et al., 2006; Vazquez et al., 2009).

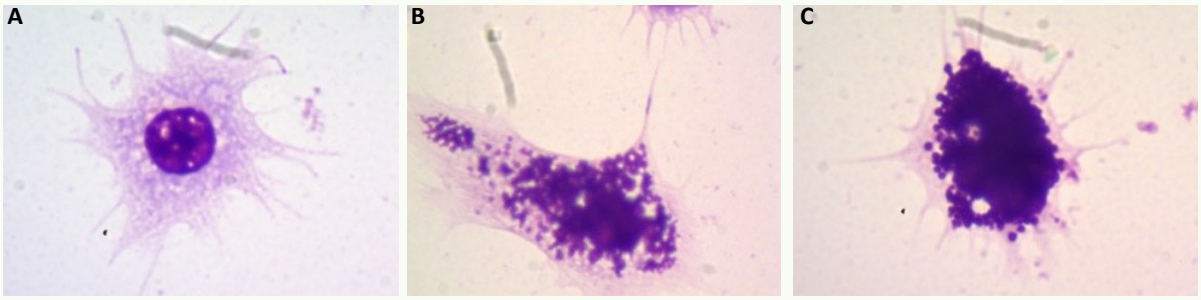

Figure E4.1 : Illustration des trois types hémocytaires chez *A. vulgare*. Observation au microscope optique après coloration Giemsa. (A) Hémocyte hyalin (8 µm). (B) Hémocyte semi-granulaire (12 µm). (C) Hémocyte granulaire (12 µm). Photographies UMR CNRS 7267.

Lorsque les pathogènes sont de petite taille, ils peuvent être phagocytés par les hémocytes. Chez *A. vulgare*, la phagocytose semble être principalement effectuée par les hémocytes hyalins ainsi qu'une faible proportion d'hémocytes semi-granulaires (Chevalier *et al.*, 2011). Pour un corps étranger de plus grande taille, les hémocytes s'accumulent tout autour en formant des couches concentriques, ce qui constitue le phénomène d'encapsulation. Les granules intra-cytoplasmiques sont alors libérés au sein de la capsule, les molécules cytotoxiques qu'elles contiennent conduisant à la dégradation du pathogène. Chez *A. vulgare*, l'encapsulation est principalement réalisée par les hémocytes semi-granulaires et granulaires (Chevalier *et al.*, 2011).

La détection d'un pathogène au sein de l'organisme peut également conduire à diverses réponses ayant lieu directement dans l'hémolymphe, telles que la coagulation, l'activité phénoloxydase ou l'action de peptides antimicrobiens. Les hémocytes sont également impliqués dans la réalisation de ces réponses humorales (Johansson *et al.*, 2000).

à un paramètre immunitaire (Viney *et al.*, 2005) tel que la densité hémocytaire. Un fort taux d'hémocytes reflète-t-il un meilleur potentiel de défense contre les pathogènes ? Au contraire, ce fort taux est-il le reflet d'un individu en moins bonne santé, luttant déjà contre des pathogènes présents dans son environnement ? Une autre possibilité est qu'un individu de mauvaise qualité ait besoin de produire plus d'hémocytes afin d'être aussi efficace dans la lutte contre les pathogènes. Ainsi, la corrélation hétérozygotie-densité hémocytaire remarquée dans cette étude pilote restait largement inexpliquée, et nécessitait une investigation plus poussée.

La présente étude a pour objectif de rechercher un lien entre hétérozygotie et immunité chez *A. vulgare*, espèce pour laquelle la présence de SNP dans des transcrits immunitaires et une corrélation négative entre hétérozygotie et densité hémocytaire constituent des indices prometteurs. Nous avons souhaité reproduire les résultats précédemment obtenus sur la densité hémocytaire, d'autant plus que les hémocytes sont un élément clé du système immunitaire des crustacés. Nous souhaitions également compléter ces observations avec la viabilité hémocytaire, qui pourrait elle aussi conditionner la *fitness* des individus via leur capacité à répondre aux pathogènes. Afin de déterminer le « sens » du paramètre mesuré, les animaux ont été placés en situation de *challenge* immunitaire pour déterminer l'impact des paramètres sur l'efficacité de réponse contre l'agent infectieux. L'injection de la bactérie pathogène *Salmonella* (Braquart-Varnier *et al.*, 2015) nous a donc permis de tester si la réponse du cloporte à l'infection est dépendante des paramètres immunitaires d'intérêt mesurés hors situation de *challenge*, via une potentielle influence de l'hétérozygotie.

Cette étude a été étendue aux mâles, absents de l'étude pilote. En effet, les corrélations hétérozygotie-fitness sont parfois présentes chez un seul sexe (Prugnolle *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2013). Par ailleurs, les mâles et les femelles diffèrent très souvent en termes de paramètres immunitaires (Rolff, 2001; Rigaud & Moret, 2003; Roberts *et al.*, 2004), ce qui peut s'expliquer par une allocation de ressources différentes entre les deux sexes. Le cloporte ne fait pas exception : les mâles présentent une activité phénoloxidase moindre que les femelles, mais ils possèdent aussi plus d'hémocytes (Sicard *et al.*, 2010), justifiant d'autant plus notre intérêt pour la variable « sexe ».

Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, les HFC peuvent émerger en cas de stress. La majorité des études à ce sujet porte sur des stress d'origine abiotique (Da Silva *et al.*, 2006; Fox & Reed, 2011; Annavi *et al.*, 2014), mais l'effet de stress biotiques sur les HFC reste largement méconnu. Dans ce contexte, nous avons introduit dans cette étude l'endosymbionte *Wolbachia* en tant que source de stress biotique. *Wolbachia* est en effet connue pour avoir une incidence sur l'immunité de son hôte *A. vulgare*, en particulier sur l'expression de gènes de l'immunité (Chevalier *et al.*, 2012) et sur la densité hémocytaire (Sicard *et al.*, 2010), et confère une protection face au pathogène *Salmonella* (Braquart-Varnier *et al.*, 2015). De par cette protection face à *Salmonella*, le choix de *Wolbachia* en tant que stress biotique est pertinent pour rechercher un impact du stress sur les HFC concernant l'immunocompétence de notre modèle.

Ainsi, la présente étude vise à rechercher un effet de l'hétérozygotie sur l'immunocompétence du cloporte via la mesure de la densité et la viabilité hémocytaire, ainsi qu'une variation potentielle de cet effet selon le sexe et la présence de *Wolbachia*. Afin de déterminer si les variations observées sont un gage de meilleure fitness, le système immunitaire des animaux est mis à l'épreuve en situation d'infection par le pathogène *Salmonella*. Nous profitons également de cette expérience pour investiguer la corrélation entre hétérozygotie et taille corporelle suggérée dans la partie précédente, cette fois-ci en utilisant la masse des individus comme estimateur. Par ailleurs, les échantillons et les données générées seront utilisés à la suite de cette thèse pour tester de nouveaux marqueurs génétiques de type SNP, n'ayant pour l'instant jamais été génotypés chez un isopode terrestre.

II. Matériel et méthodes

1) Matériel biologique

Deux lignées de laboratoire ont été utilisées au cours de cette étude. La première est la lignée asymbiotique WXa, utilisée dans toutes les expérimentations en laboratoire présentées dans ce manuscrit. La deuxième lignée est la lignée symbiotique WXiw, partageant le fond génétique de WXa mais hébergeant la souche *w*VulC de *Wolbachia*. Cette lignée a été générée à partir de 35 femelles WXa ayant été injectées avec un broyat d'ovaires provenant de cinq femelles WXiw infectées par la souche *w*VulC de *Wolbachia*. Ces femelles injectées ont été mises en croisement avec des mâles WXa afin de produire la première génération d'individus WXiw. Par la suite, chaque année, 20 à 40 femelles WXiw (préférentiellement sélectionnées dans des portées à sex-ratio biaisé en faveur des femelles) sont croisées avec des mâles WXa afin d'entretenir la lignée. Les biais de sex-ratio en faveur des femelles dans la majorité des portées WXiw suggèrent que la bactérie a bien été transmise au cours des cinq générations que compte actuellement cette lignée. Cela dit, des tests PCR sont effectués sur les animaux utilisés dans les expériences afin de confirmer la présence de la bactérie.

Tous les animaux utilisés étaient vierges, âgés d'un an, et ont été sélectionnés en période d'intermue. A l'origine, cette étude devait porter sur trois catégories d'animaux, à savoir des mâles (lignée WXa), des femelles asymbiotiques (lignée WXa, ci-après nommées femelles *Wo*-) et des femelles symbiotiques (lignée WXiw, ci-après nommées femelles *Wo*+). Cependant, nous avons vite été confrontés à des contraintes relatives au cycle de vie d'*A. vulgare*. Une première partie de cette expérience a en effet été réalisée en 2016 au mois de mars, or cette époque correspond au début de la période de reproduction d'*A. vulgare*. L'augmentation de la photopériode induit chez les femelles l'entrée en reproduction avec la vitellogenèse II (Mocquard *et al.*, 1989), aboutissant à une mue parturielle et à la ponte des œufs dans le *marsupium*. Ce phénomène peut se produire même sans accouplement : la femelle vierge pond alors des œufs non fécondés, phénomène appelé « ponte blanche ». C'est donc dans cet état de gravidité que se trouvait la quasi-totalité des femelles disponibles dans l'élevage lorsque nous avons réalisé notre expérience. Trop peu de femelles non

gravides étant disponibles, nous avons dû nous résoudre à utiliser des femelles asymbiotiques et symbiotiques gravides (nommées *Wo*-$_G$ et *Wo*+$_G$ par la suite). Même si cela nous a permis de mieux identifier et décrire pour la première fois ce statut de gravidité en terme d'immunité, comparer des mâles à des femelles gravides ne permet pas de déterminer si les différences observées sont un effet du sexe des individus ou de la gravidité des femelles, d'autant que de nombreuses études soulignent un fort impact de la gravidité sur l'immunité chez les Euthériens (Weetman, 1999). Nous avons donc décidé de reproduire la même expérience en janvier de l'année suivante (2017), avant la période de reproduction, pour obtenir des femelles asymbiotiques et symbiotiques non gravides (femelles *Wo*-$_{NG}$ et *Wo*+$_{NG}$) que nous pouvons comparer aux mâles. La répartition de cette expérience sur deux ans a cependant des conséquences sur l'interprétation des résultats, le statut de gravidité des femelles étant corrélé à l'année (voir partie « Analyses statistiques » pour plus d'informations).

2) Description générale du protocole expérimental

a) Expérience 1 : suivi des paramètres immunitaires

Une première expérience a pour but de mettre en évidence un effet de l'hétérozygotie, mais aussi du sexe et du statut symbiotique et de la gravidité chez les femelles, sur la masse des animaux ainsi que leur immunité. Nous avons ainsi choisi d'étudier des paramètres hémocytaires ainsi que leurs variations suite à une infection par un pathogène. Pour ce faire, 49 mâles, 49 femelles *Wo*-$_G$ et 52 femelles *Wo*+$_G$ ont été utilisées en 2016, tandis que 46 femelles *Wo*-$_{NG}$ et 65 femelles *Wo*+$_{NG}$ ont été utilisées en 2017. Nous avons appliqué le protocole suivant (**Figure 11**):

- *Etape 1 (J0)* : le premier jour, les individus ont été pesés à l'aide d'une balance Sartorius ED124S d'une précision de 10^{-4} g, puis un prélèvement d'hémolymphe a permis de mesurer le taux d'hémocytes circulants et la viabilité hémocytaire.
- *Etape 2 (J6)* : après une période de repos de six jours, une injection a été réalisée avec soit 10^5 bactéries *Salmonella typhimurium*, soit du milieu de culture stérile (Luria-Bertani, LB) pour les témoins.

- *Etape 3 (J7)* : 24 h après l'injection, un nouveau prélèvement d'hémolymphe a été réalisé pour mesurer à nouveau le taux d'hémocytes circulants et la viabilité hémocytaire, mais aussi pour réaliser un étalement sur milieu de culture solide afin d'estimer le nombre de bactéries circulantes (CFU, *Colony Forming Units*). Les animaux ont par la suite été conservés à -20 °C en vue de l'extraction ultérieure de leur ADN. Cet extrait ADN nous permet ensuite d'accéder à la fois à l'hétérozygotie mais aussi à la vérification du statut symbiotique (présence ou non de *Wolbachia*) de chaque individu par l'analyse des marqueurs génétiques.

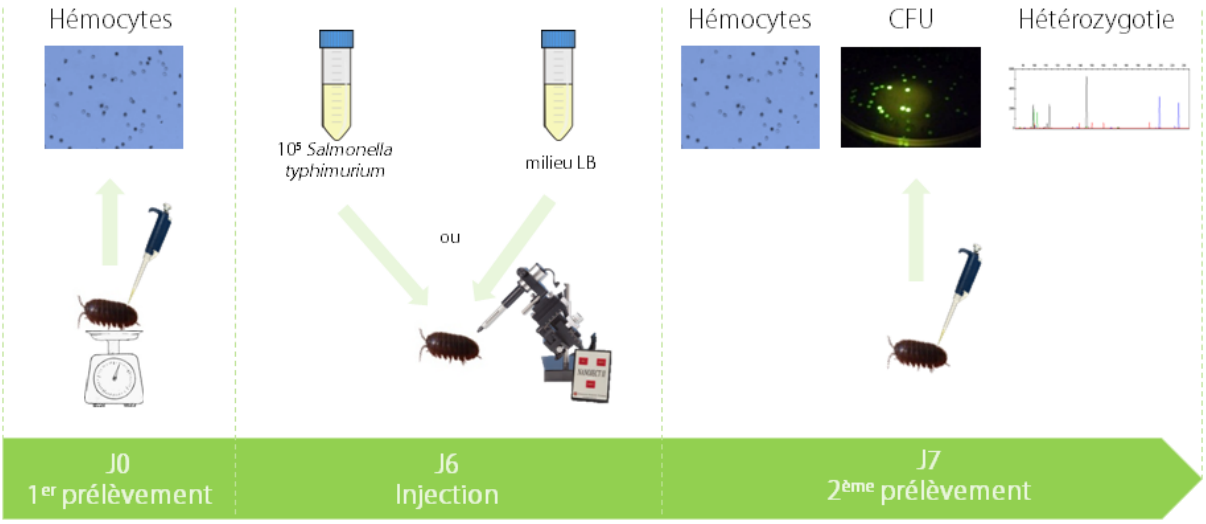

Figure 11 Schéma du protocole expérimental suivi des paramètres immunitaires. Une expérience pilote nous a permis de déterminer que la densité hémocytaire chute suite à un prélèvement de 5 µL, mais revient au niveau initial 24 h plus tard. Le délai de six jours entre le premier prélèvement et l'injection permet donc aux animaux de remplacer les hémocytes prélevés à J0.

Au cours du protocole, chaque animal a été isolé dans une boite dont le fond était recouvert de papier humidifié. Le nombre d'animaux étant conséquent (N = 251), les individus ont été répartis en dix groupes indépendants, ci-après nommés « blocs », comprenant chacun une trentaine d'animaux environ (cinq blocs en 2016 et cinq en 2017). Des évènements de mortalité ont pu être observés suite au prélèvement d'hémolymphe et à l'injection de solution, ces interventions invasives expliquant les variations d'effectif entre chaque étape de notre protocole (**Tableau 1**).

Tableau 1 Effectifs sur lesquels nous avons travaillé à chaque étape de notre protocole de l'expérience 1, pour les cinq catégories d'animaux étudiées sur les deux années de cette expérience.

Etape	**Effectif**	♂	♀ ***Wo-***$_{G}$	♀ ***Wo+***$_{G}$	***Total 2016***	♀ ***Wo-***$_{NG}$	♀ ***Wo+***$_{NG}$	***Total 2017***	***Total 2016 + 2017***
1er prélèvement (J0)	Total	49	49	52	*150*	46	55	*101*	*251*
Injection (J6)	Total	48	45	48	*141*	41	55	*96*	*237*
	dont LB	11	10	11	*32*	8	10	*18*	*50*
	dont *Salmonella*	37	35	37	*109*	33	45	*78*	*187*
2e prélèvement (J7)	Total	43	36	41	*120*	37	42	*79*	*199*
	dont LB	11	9	11	*31*	7	9	*16*	*47*
	dont *Salmonella*	32	27	30	*89*	30	33	*63*	*152*

b) Expérience 2 : suivi de la survie

Afin d'étudier le lien entre les variations observées dans les paramètres immunitaires suite à l'infection par *Salmonella* et la valeur sélective des animaux, nous avons choisi de compléter notre étude avec un suivi de la survie des individus. Cette expérience a été réalisée en janvier 2017, et ne porte donc que sur des femelles non gravides (30 femelles *Wo-*$_{NG}$ et 29 femelles *Wo+*$_{NG}$) ainsi que des mâles (30 individus). Les deux premières étapes sont rigoureusement identiques à l'expérience 1 (premier prélèvement à J0 et injection à J6). Ainsi, 56 animaux ont été injectés avec le pathogène (19 mâles, 18 femelles *Wo-*$_{NG}$ et 19 femelles *Wo+*$_{NG}$) et 30 avec du milieu de culture stérile (10 animaux pour chacune des trois catégories), puis leur survie a été suivie pendant six semaines. L'ADN se dégradant très vite en l'absence de congélation immédiatement après la mort de l'individu, nous n'avons pas pu collecter de tissu suite à l'expérience. C'est pourquoi nous avons anticipé en prélevant une patte à chaque individu avant l'expérimentation (**Figure 12**) pour obtenir des tissus de bonne qualité et donc une information génétique associée sur l'hétérozygotie et le statut symbiotique de chaque individu. Nous avons ainsi collecté les pattes de 155 animaux afin de maximiser nos chances d'obtenir un effectif suffisant d'animaux en intermue au moment de l'expérience. Les pattes ont été collectées en novembre 2016, soit deux mois à l'avance, de sorte que les animaux aient le temps de reconstituer une patte après une voire deux mues. Là encore, les animaux ont été répartis en quatre blocs indépendants et isolés au cours de l'expérience.

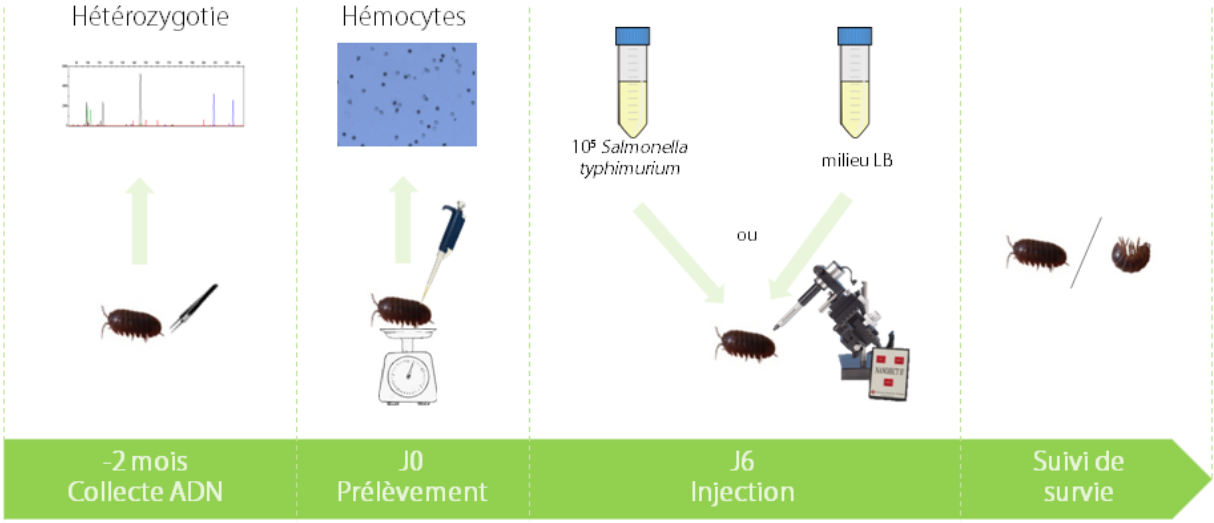

Figure 12 Schéma du protocole expérimental suivi de survie.

3) Injection de pathogènes

a) Souche utilisée

Pour les infections bactériennes, nous avons utilisé la bactérie Gram-négative *Salmonella enterica* sérotype typhimurium, pathogène répandu chez les arthropodes (Rottschaefer & Lazzaro, 2012). Ce bacille aérobie facultatif est présent dans les sols (Jacobsen & Bech, 2012), milieu de prédilection des cloportes, et est connu pour être pathogène chez *A. vulgare* dans un contexte d'infection expérimentale (Braquart-Varnier *et al.*, 2015). La souche utilisée ici possède un plasmide lui conférant une expression constitutive de la GFP et une résistance à l'ampicilline.

b) Culture bactérienne

Après culture en milieu liquide LB à 37 °C sous agitation (180 rpm) *overnight*, 100 µL de solution de *Salmonella* ont été étalés sur du milieu LB solide (LB + 1,5 % d'agar-agar) et incubés à 37 °C *overnight* pour obtenir des colonies. La veille de chaque injection, une colonie bactérienne a été suspendue dans 5 mL de LB liquide et cultivée toute la nuit. Le lendemain, 100 µL de cette solution ont été placés dans 3 mL de LB liquide et incubés pendant environ 2h, tout en suivant régulièrement la densité optique à 600 nm afin d'évaluer la croissance bactérienne jusqu'à atteindre une densité optique de 0,7. Cette valeur correspond à une concentration de $7x10^5$ bactéries/µL, les bactéries étant alors en phase de croissance exponentielle. Nous avons alors prélevé 1 mL de cette solution que nous avons centrifugé à 13000 g pendant 2 min à 4 °C. Le surnageant contenant des toxines a été éliminé, puis

nous avons repris le culot dans 700 µL de LB liquide afin d'obtenir une solution à 10^6 bactéries/µL utilisée par la suite pour l'injection. Une dilution sériée de cette solution suivie d'un étalement sur milieu solide a été systématiquement réalisée dans le but de vérifier *a posteriori* la concentration de la solution injectée.

c) Injection

Nous avons réalisé les injections sous loupe binoculaire en milieu stérile à l'aide d'un injecteur automatique Nanoject II (Drummond). Pour ce faire, nous avons immobilisé les animaux sur un portoir leur permettant d'adopter une position semi-arrondie, de sorte que l'aiguille (constituée d'un capillaire effilé) puisse se glisser entre les tergites 6 et 7 et traverser la membrane articulaire (**Figure 13**). Nous avons injecté 100 nL soit de milieu LB stérile, soit de la culture bactérienne (10^5 bactéries injectées par individu). Cette dose a été choisie au cours d'une expérience pilote afin que les animaux ne meurent pas avant le deuxième prélèvement 24 h après l'injection au cours de l'expérience 1, mais est suffisamment létale pour observer une mortalité au cours de l'expérience 2. Un étalement sur milieu solide du LB ainsi que d'une dilution sériée de la solution de *Salmonella* injectée est systématiquement réalisé dans le but de vérifier respectivement l'absence et la concentration en bactéries des différentes solutions.

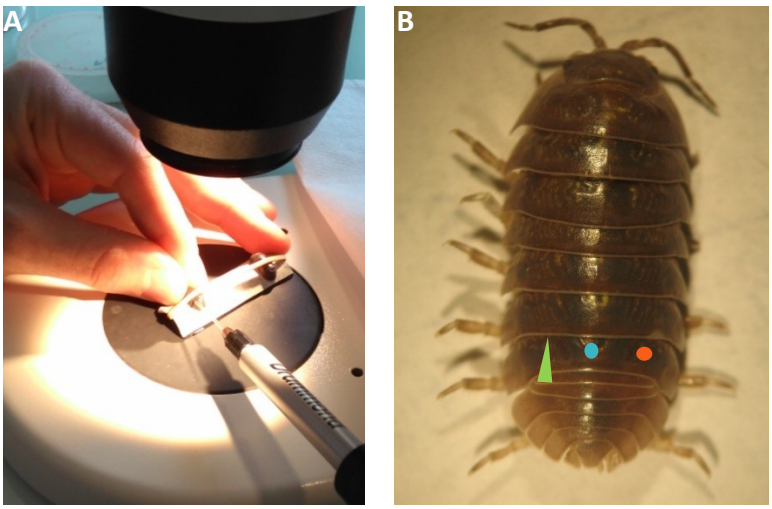

Figure 13 Illustration des procédures d'injection et de prélèvement. (A) Deux cloportes disposés sur le portoir et maintenus par un élastique. Le capillaire monté sur l'injecteur est glissé entre les tergites. (B) Points de l'injection (triangle vert), du premier prélèvement d'hémolymphe à J0 (point orange) et du deuxième prélèvement à J7 (point bleu). Photographies UMR CNRS 7267.

4) Mesure des paramètres immunitaires

a) Prélèvement d'hémolymphe

Le prélèvement d'hémolymphe à J0 a été réalisé après avoir percé un trou à droite du vaisseau dorsal dans le sixième tergite (**Figure 13B**) à l'aide d'une aiguille stérile pour collecter 5 µL de l'hémolymphe perlant au niveau du trou. Pour les animaux de l'expérience 1, un deuxième prélèvement à J7 a été réalisé de la même manière mais au niveau du vaisseau dorsal, et 10 µL d'hémolymphe ont été collectés, à savoir 5 µL pour mesurer la densité et la viabilité hémocytaire, et 5 autres pour estimer la charge bactérienne.

b) Densité et viabilité hémocytaire

Les 5 µL d'hémolymphe prélevés ont immédiatement été déposés dans 10 µL d'une solution de MAS (Modified Alsever's Solution : 9 mM EDTA, 115 mM glucose, 336 mM NaCl, 27 mM citrate de sodium, pH 7) afin d'éviter la coagulation, ainsi que 5 µL de bleu de Trypan. Ce colorant pénètre dans toutes les cellules, mais est de suite rejeté des cellules vivantes qui apparaissent alors blanches, ce qui permet de les discriminer des cellules mortes au sein desquelles le bleu de Trypan s'accumule. Par la suite, 10 µL de cette solution ont été déposés dans la chambre d'une lame de comptage et insérés dans le compteur automatique de cellule Countess™ (Invitrogen). Cet appareil a permis d'obtenir le nombre d'hémocytes par millilitre, ainsi que le pourcentage de cellules vivantes.

c) Charge bactérienne dans l'hémolymphe

Dans le cas de l'expérience 1, les 5 µL d'hémolymphe supplémentaires prélevés à J7 ont été immédiatement placés dans 195 µL de milieu LB stérile. Après homogénéisation, 100 µL de cette solution ont été étalés sur milieu LB solide enrichi en ampicilline (100 µg / L) et incubés une nuit. La présence d'ampicilline limite la croissance d'autres bactéries que *Salmonella* présentes dans l'hémolymphe. L'émission de fluorescence nous a permis d'identifier les colonies de *Salmonella* et de les dénombrer.

5) Analyses génétiques

a) Marqueurs concernés

Concernant l'estimation de la diversité génétique individuelle, nous avons utilisé les mêmes onze marqueurs microsatellites que dans l'ensemble des études rassemblées dans ce manuscrit afin d'estimer l'hétérozygotie. Nous avons également décidé d'utiliser les extractions ADN réalisées ainsi que les données immunitaires générées par cette expérience afin de tester d'autres types de marqueurs génétiques sur notre modèle. Des marqueurs de type SNP seront donc développés prochainement sur les animaux issus de l'expérience 1. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des techniques issues des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS). Ces méthodes nécessitent une grande quantité d'ADN de bonne qualité, ce qui ne peut pas être obtenu à partir de la seule patte prélevée chez les animaux de l'expérience 2. Ainsi seuls les animaux de l'expérience 1 seront génotypés pour les marqueurs SNP.

b) Extraction de l'ADN

Afin d'obtenir une bonne qualité d'ADN pour les animaux de l'expérience 1 en vue d'un développement de SNP, le kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen a été utilisé sur la tête, les pattes, les gonades et la chaine nerveuse des individus. Les instructions du fabricant ont été modifiées afin d'optimiser l'extraction pour notre modèle (I. Giraud, communication personnelle, annexe 3). L'ADN a été extrait de la patte des animaux de l'expérience 2 suivant une extraction à la résine de Chelex, comme décrit par Durand *et al.* (2017).

c) Estimation de la diversité génétique

Les onze marqueurs microsatellites ont été amplifiés sur les 199 individus ayant survécu jusqu'à J7 pour l'expérience 1 et sur les 89 individus de l'expérience 2 selon les mêmes conditions que pour les autres études présentées dans ce travail de thèse (Durand *et al.*, 2015, 2017; Valette *et al.*, 2017). La migration des produits PCR sur un séquenceur automatique a été réalisée par la société Genoscreen (Lille) pour les 120 échantillons de 2016 (expérience 1), et sur le séquenceur local de l'Université de Poitiers (Applied Bio System 3130 Avant) pour les 168 échantillons de 2017 (expériences 1 et 2).

Comme pour l'ensemble des analyses présentées dans ce manuscrit, la lecture des génotypes a été faite avec le logiciel GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems), et la fonction GenHet (Coulon, 2010) sous R a permis d'obtenir les valeurs d'hétérozygotie multilocus (proportion de *loci* hétérozygotes) pour chaque individu.

La génération des données concernant les SNP par GBS (*Genotyping-By-Sequencing*, Elshire *et al.*, 2011) a été confiée à The Elshire Group Ltd (Palmerston North, Nouvelle-Zélande) à partir des échantillons d'ADN purs. Cette méthode basée sur la technologie de séquençage Illumina présente l'avantage de détecter et génotyper simultanément un grand nombre de SNP (plusieurs milliers) sur de nombreux individus grâce à l'utilisation de *multiplex*, sans nécessiter obligatoirement un génome de référence. En bref, cette méthode réduit la complexité du génome par digestion avec une ou plusieurs enzymes de restriction, puis focalise l'effort de séquençage sur l'extrémité des fragments. Les séquences ainsi obtenues sont alignées (éventuellement sur le génome de référence si celui-ci est disponible) afin de détecter les polymorphismes intervenant sur un seul nucléotide grâce à des outils bioinformatiques. Nous avons ainsi sélectionné 188 individus de l'expérience 1 pour cette procédure, ce qui correspond au format de *multiplex* utilisé par The Elshire Group Ltd. A l'heure actuelle, la librairie Illumina pour nos échantillons a été générée après digestion par l'enzyme ApeKI et a été séquencée. L'analyse bioinformatique de ces résultats aura lieu au cours de l'année 2018.

d) Contrôle du statut symbiotique par PCR

La présence ou l'absence de *Wolbachia* a été vérifiée en amplifiant le gène *wsp* (*Wolbachia surface protein*). Le couple d'amorces 81-F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') et 691-R (5'-AAAAATTAAACGC-TACTCCA -3') (Braig *et al.*, 1998) a été utilisé à l'aide du kit GoTaq de Promega dans les conditions réactionnelles suivantes : 5 µL de tampon 5X, 2,5 µL de dNTP, 2,5 µL de chaque amorce à 10 µM, 0,125 µL de GoTaq polymérase (5 U/µL) et 11,875 µL d'eau stérile pour 1 µL d'ADN. Le programme d'amplification était le suivant : un premier cycle de 10 min à 95 °C, 35 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 55 °C et 1 min à 72 °C puis un cycle d'élongation final de 10 min à 72 °C. La présence ou l'absence de bande a été vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1,5 % pendant 30 min à 100 V.

L'amplification de ce marqueur réalisée sur les animaux de l'expérience 1 a confirmé leur statut symbiotique. En revanche, aucune amplification de *wsp* n'a pu être observée pour les animaux de l'expérience 2. Il est probable que l'extraction d'ADN sur patte à la résine de Chelex n'ait pas permis d'obtenir assez d'ADN bactérien pour amplifier le gène *wsp*. Une deuxième vérification à l'aide d'un autre marqueur de *Wolbachia* (marqueur *ftsz* (Werren *et al.*, 1995)) sera prochainement réalisée.

6) Analyses statistiques

Pour le jeu de données issue de chacune de nos expériences, nous avons utilisé le package « inbreedR » (Stoffel *et al.*, 2016) pour calculer le paramètre g_2. Cette mesure permet d'estimer le déséquilibre d'identité entre loci, soit la corrélation d'hétérozygotie, et ainsi d'estimer si l'hétérozygotie de nos marqueurs microsatellites représente celle du génome. Nous avons utilisé la fonction « g2_microsats » avec 10 000 permutations et 10 000 bootstraps.

Nous avons utilisé des modèles linéaires mixtes généralisés (GLMM) ou non (LMM) pour analyser nos données sous R, en fonction de la distribution de la variable réponse. (i) La masse, mesurée en grammes, a été modélisée par un LMM. (ii) La densité hémocytaire, exprimée en 10^4 cellules / mL d'hémolymphe, et (iii) la viabilité hémocytaire, en pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules, ont été modélisées par un GLMM avec lien log et variance donnée par une distribution négative binomiale en raison de leur surdispersion. Enfin, (iv) la charge bactérienne (CFU) présentant une distribution très particulière, nous avons du recourir à une transformation. La variable $\sqrt{\log(CFU + 1)}$ a donc été modélisée par un LMM. Les modèles ont été réalisés avec la fonction « glmmadmb » du package « glmmADMB » (Skaug *et al.*, 2016). Pour chaque variable réponse, nous avons utilisé l'hétérozygotie, la catégorie des animaux ainsi que leur interaction en tant que variables explicatives. Pour modéliser la charge bactérienne, deux autres modèles supplémentaires ont été testés, avec soit la densité hémocytaire, soit la viabilité hémocytaire après injection en tant que variable explicative. Dans tous les cas, un effet aléatoire a été inclus dans les modèles afin de prendre en compte un effet potentiel du bloc auquel appartiennent les animaux.

Pour l'expérience 1, nous avons utilisé un modèle pour mesures répétées afin d'étudier la variation de densité et viabilité hémocytaire après une injection pour chaque individu. Pour cela, un effet aléatoire sur l'identité de chaque individu a été inclus dans un GLMM pour prendre en compte les corrélations entre les deux mesures. Cet effet aléatoire sur l'identité de l'individu a été emboité dans un effet aléatoire sur le bloc. Afin de construire nos modèles, nous avons rajouté une variable « date » pour indiquer si la mesure a été faite à J0 ou à J7. La variable réponse (densité ou viabilité hémocytaire) a d'abord été modélisée en fonction d'une interaction entre la date et le traitement, afin de vérifier que l'injection de *Salmonella* a bien des effets différents d'une injection de LB. Par la suite, un deuxième modèle a été construit uniquement avec les animaux ayant reçu *Salmonella* en intégrant une interaction entre date et hétérozygotie, ainsi qu'entre date et catégorie.

En ce qui concerne l'expérience 2, des analyses de survie ont été conduites avec la fonction « coxme » du package « coxme » (Therneau, 2015). De même que précédemment, un effet aléatoire a été inclus sur le bloc. Un premier modèle a permis d'évaluer l'effet du traitement sur la survie, puis un second modèle portant uniquement sur les animaux injectés avec *Salmonella* a permis de tester l'effet de l'hétérozygotie et de la catégorie sur la survie, avec une interaction entre ces deux variables.

Dans tous les cas, l'effet des variables a été testé avec une anova de type 2, et les variables non significatives ont été retirées une par une du modèle complet jusqu'à ce qu'il ne reste que des variables avec $p<0.1$ dans le modèle minimal, en conservant toutefois les effets principaux des variables incluses dans des interactions significatives. L'ensemble des modèles complets ainsi que les modèles minimaux correspondants sont répertoriés dans l'annexe 4. Les coefficients sont présentés sur l'échelle lien pour les variables quantitatives, et les comparaisons multiples entre différents niveaux d'une variable qualitative ont été réalisés avec le package « multcomp » (Hothorn *et al.*, 2008).

L'interprétation de l'ensemble de ces modèles devra se faire avec précaution, car il convient de garder en tête que la structure de notre expérimentation n'était pas équilibrée, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'expérience 1 a été réalisée sur deux ans en raison des contraintes biologiques précédemment évoquées. Il en résulte une corrélation entre les blocs expérimentaux et la catégorie des

animaux (**Figure 14**), toutes les femelles non gravides ayant été testées dans d'autres blocs que les mâles et les femelles gravides. Il existe alors un risque qu'une partie de la variance due à la catégorie (femelles non gravides) soit attribuée à tort au bloc, et inversement. De plus, en ce qui concerne la partie de l'expérience 1 réalisée en 2017, certains blocs ne comprenaient que des femelles $Wo+_{NG}$ (**Figure 14**). Ici aussi, une corrélation entre bloc et catégorie peut conduire à une mauvaise attribution de variance, ce qui pourrait biaiser les résultats concernant les femelles $Wo+_{NG}$.

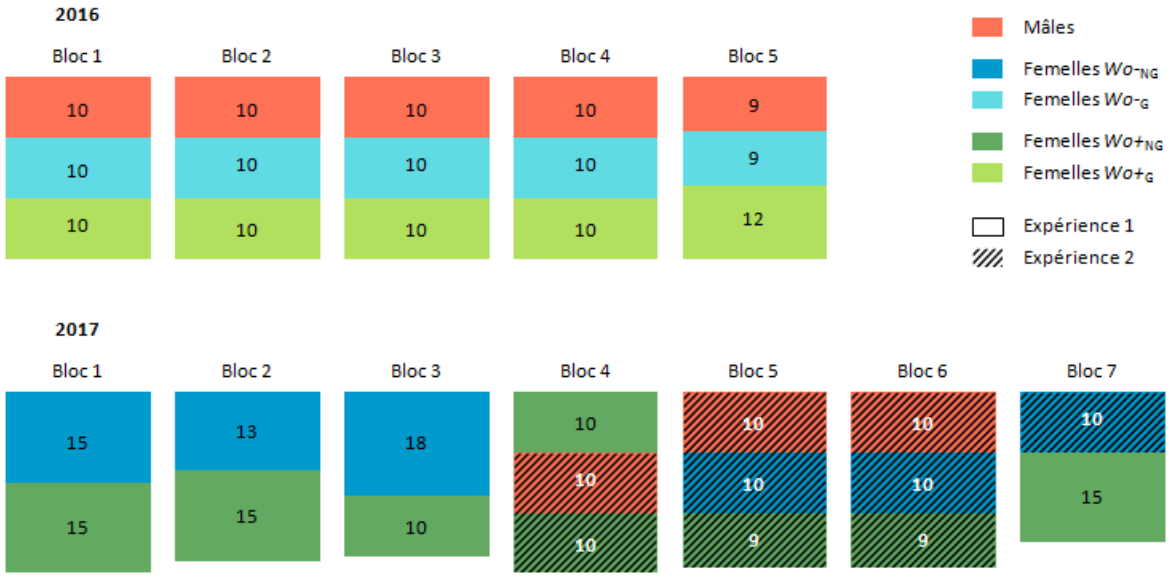

Figure 14 Illustration des différents blocs composant les deux expériences réparties sur deux ans. La hauteur des rectangles est proportionnelle à l'effectif, indiqué au centre du rectangle. Les femelles $Wo+_{NG}$ présentes dans le bloc 7 ont été rajoutées pour pallier à une mortalité un peu plus forte dans cette catégorie avant même l'injection, permettant ainsi d'obtenir des effectifs équilibrés entre chaque catégorie. Les blocs 4 et 7 de 2017 contiennent ainsi une seule catégorie pour l'expérience 1.

III. Résultats

1) Corrélation d'hétérozygotie entre paires de loci

Pour les 199 individus génotypés dans l'expérience 1, la valeur de g_2 est de 0,012 ± 0,008, avec p = 0,048. Ainsi, la corrélation d'hétérozygotie entre loci est significativement différente de 0, indiquant que ce jeu de données est susceptible de permettre la détection d'HFC due à un effet général. En revanche, pour les 139 individus génotypés dans l'expérience 2, g_2 n'est que de 0,008 ± 0,010, ce

qui correspond à une p-value de 0,21. Les analyses réalisées sur ce jeu de données sont donc moins puissantes, probablement à cause du plus faible effectif utilisé.

2) Expérience 1 : suivi des paramètres immunitaires

a) Etat basal des paramètres (J0)

La masse des individus est influencée par leur catégorie (χ^2 = 115,4, degrés de liberté (ddl) = 4, p < 0,001, n = 199) ainsi que leur hétérozygotie (χ^2 = 8,72, ddl = 1, p < 0,001, n = 199, **Figure 15**, annexe 4), avec les individus les plus hétérozygotes présentant une masse plus importante (β = 0,04 ± 0,01).

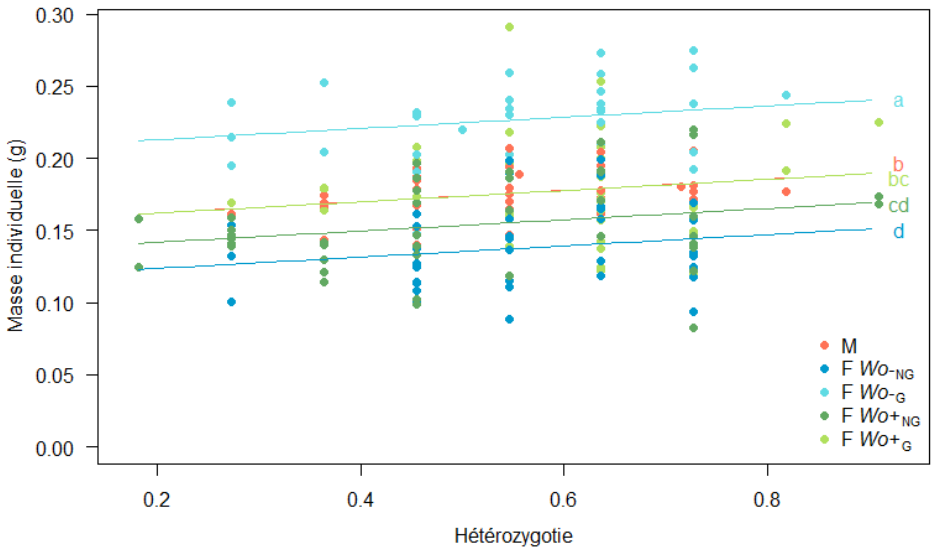

Figure 15 Effet de la catégorie et de l'hétérozygotie sur la masse des animaux. Les lettres placées dans la marge à droite indiquent les différences entre les catégories aux couleurs correspondantes.

La densité et la viabilité hémocytaires quant à elles ne dépendent pas de l'hétérozygotie (respectivement χ^2 = 0,60, ddl = 1, p = 0,44, n = 198 ; χ^2 = 0,49, ddl = 1, p = 0,49, n = 195), mais varient selon la catégorie des animaux (respectivement χ^2 = 37,45, ddl = 4, p < 0.001, n = 198, **Figure 16A** ; χ^2 = 39.95, ddl = 4, p < 0.001, n = 195, **Figure 16B**).

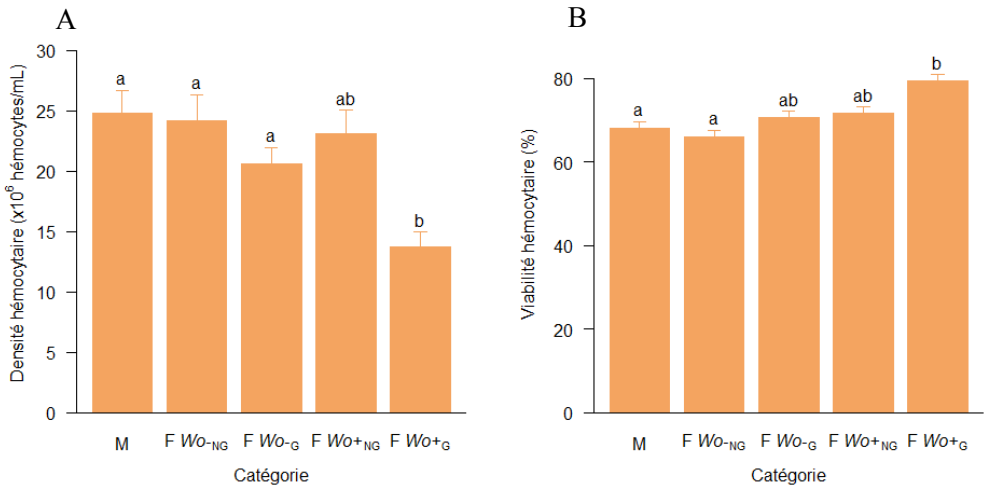

Figure 16 Niveau basal (A) de densité et (B) viabilité hémocytaires à J0 pour les cinq catégories d'animaux utilisées.

b) Effet de l'injection sur l'évolution des paramètres immunitaires

La variation des paramètres immunitaires suite à l'injection n'est pas la même selon la solution injectée, qu'il s'agisse de la densité hémocytaire (interaction traitement – date de prélèvement : χ^2 = 36,22, ddl = 1, p < 0.001, n = 187, **Figure 17A**) ou de la viabilité hémocytaire (interaction traitement – date de prélèvement : χ^2 = 4.34, ddl = 1, p = 0.037, n = 187, **Figure 17B**).

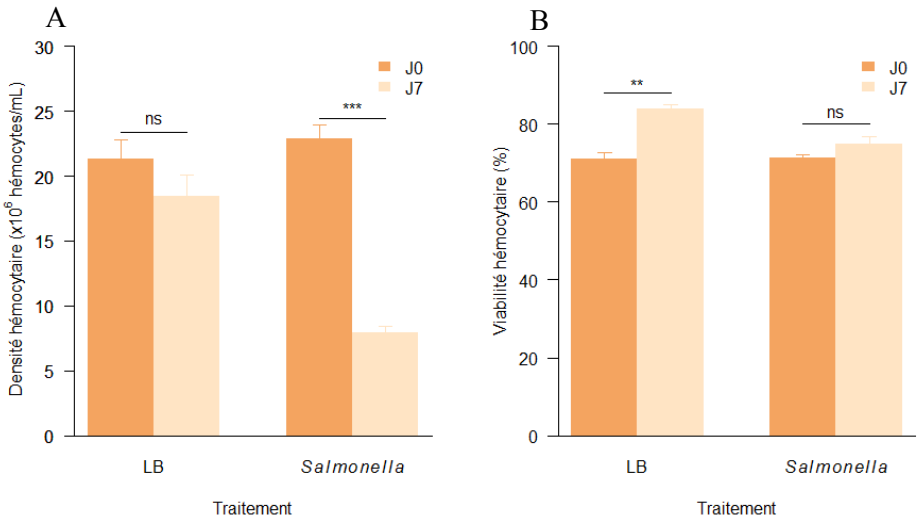

Figure 17 Comparaison de (A) la densité et (B) la viabilité hémocytaires selon le jour du prélèvement (J0 ou J7) en fonction du traitement (injection de LB ou de *Salmonella*).

Chez les individus ayant été infectés par *Salmonella*, ni l'hétérozygotie (interaction hétérozygotie – date de prélèvement : $\chi^2 = 1,21$, ddl = 1, p = 0,27, n =141), ni la catégorie (interaction catégorie – date de prélèvement : $\chi = 5,13$, ddl = 4, p = 0,27, n = 141) n'influencent la variation de densité hémocytaire après injection. Le taux d'hémocytes chute significativement entre le premier et le deuxième prélèvement ($\chi^2 = 177,18$, ddl = 1, p < 0,001, n = 141, **Figure 18**).

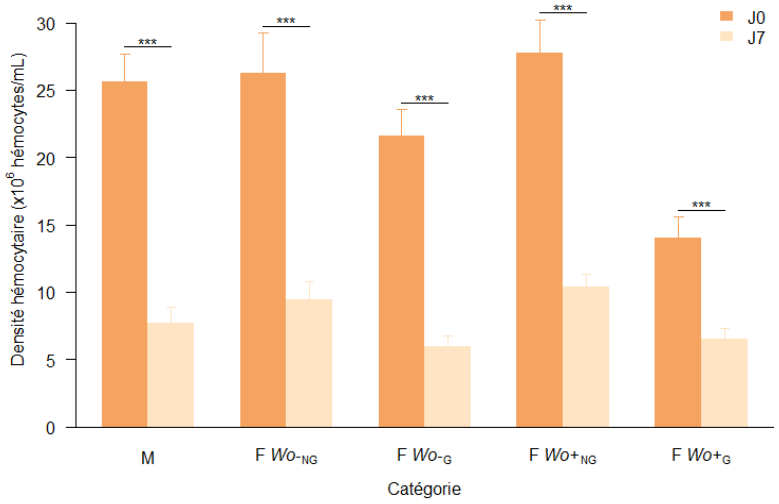

Figure 18 Comparaison de la densité hémocytaire selon le jour du prélèvement (J0 ou J7) en fonction de la catégorie de l'animal injecté avec *Salmonella*.

Si les variations de viabilité hémocytaire après injection de *Salmonella* ne sont pas influencées par l'hétérozygotie (interaction hétérozygotie – date de prélèvement : $\chi^2 = 1,21$, ddl = 1, p = 0,27, n = 141), elles le sont en revanche par la catégorie (interaction hétérozygotie – date de prélèvement : $\chi^2 = 1,21$, ddl = 1, p = 0,27, n = 141). En effet, la viabilité peut augmenter (chez les femelles non gravides *Wo*+ ou *Wo*-) ou rester stable (chez les mâles et femelles gravides *Wo*+ ou *Wo*-) (**Figure 19**).

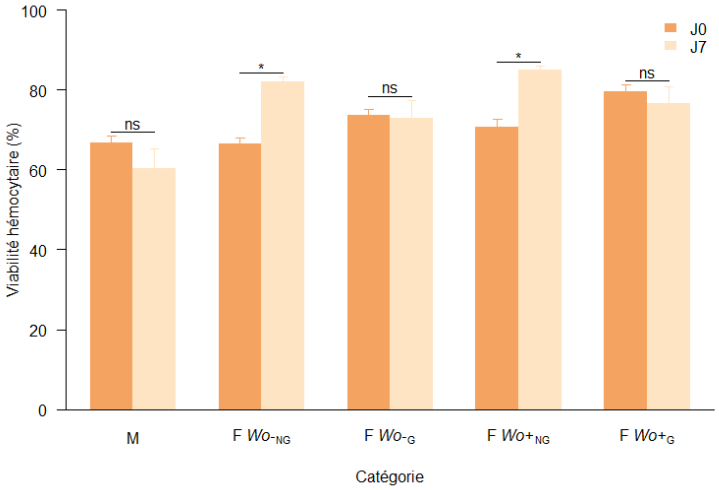

Figure 19 Comparaison de la viabilité hémocytaire selon le jour du prélèvement (J0 ou J7) en fonction de la catégorie de l'animal injecté avec *Salmonella*.

c) Paramètres après infection par *Salmonella* (J7)

Nous n'avons observé aucun effet de l'hétérozygotie (χ^2 = 0,78, ddl = 1, p = 0,38, n = 141) ni de la catégorie (χ^2 = 1,17, ddl = 4, p = 0,88, n = 141 **Figure 20A**) sur la densité hémocytaire après injection de *Salmonella*. L'hétérozygotie ne joue pas non plus sur la viabilité hémocytaire après infection (χ^2 = 3,01, ddl = 1, p = 0,08, n = 141), à l'inverse de la catégorie (χ^2 = 31,51, ddl = 4, p < 0,001, n = 141, **Figure 20B**).

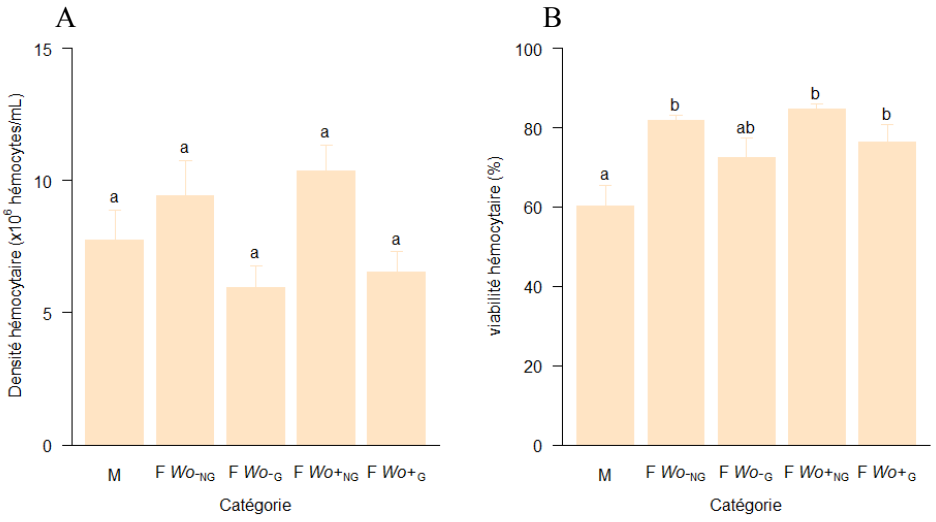

Figure 20 (A) Densité et (B) viabilité hémocytaires 24 h après injection de *Salmonella* pour les cinq catégories d'animaux utilisées.

La charge bactérienne en *Salmonella* diffère entre les catégories (χ^2= 55,91, ddl = 4, p < 0,001, n = 141, **Figure 21A**), et a tendance à augmenter avec l'hétérozygotie (χ^2 = 3,59, ddl = 1, p = 0,058, n = 141, β = 0,71+-0,38). Par ailleurs, la charge bactérienne diminue avec la densité hémocytaire (χ^2 = 18,46, ddl = 1, p < 0,001, n = 141, $\beta = -4{,}6\times10^{-4} \pm 1{,}1\times10^{-4}$, **Figure 21B**) et a tendance à diminuer avec la viabilité hémocytaire (χ^2=2,82, ddl=1, p=0,09, n =141, $\beta = -5{,}2\times10^{-3} \pm 3{,}1\times10^{-3}$).

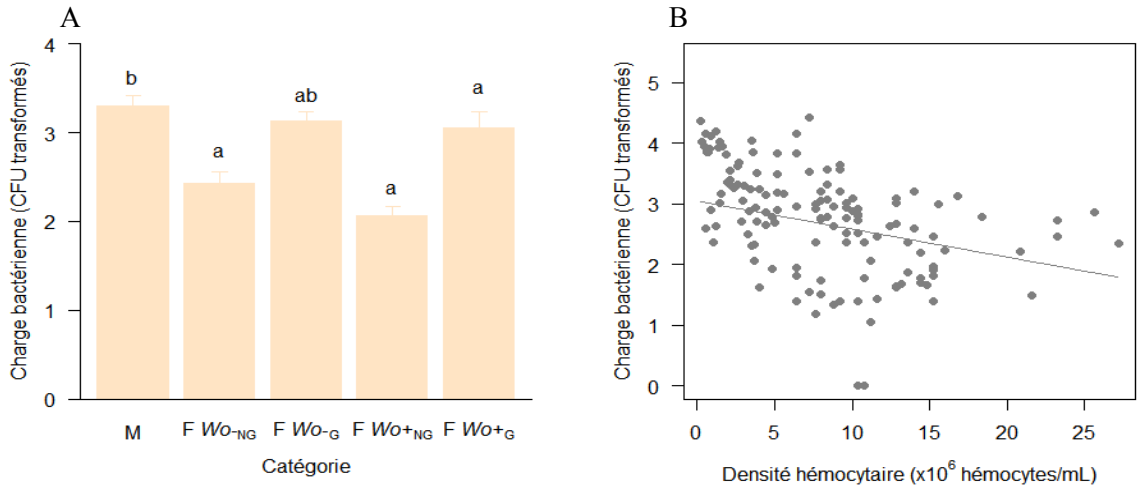

Figure 21 Charge bactérienne selon (A) la catégorie et (B) la densité hémocytaire 24 h après injection par *Salmonella*.

3) Expérience 2 : suivi de la survie

a) Etat basal des paramètres

Contrairement à ce qui a été observé dans l'expérience 1, la masse n'est pas influencée par l'hétérozygotie (χ^2 = 0,3, ddl = 1, p = 0,72, n = 88), et si elle dépend toujours de la catégorie (χ^2 = 14,14, ddl = 2, p < 0,001, n = 88), les mâles ont cette fois-ci une masse moins importante que les femelles (**Figure 22A**). La densité hémocytaire est dépendante de la catégorie (χ^2= 6,99, ddl = 2, p = 0,030, n = 75, **Figure 22B**) mais pas de l'hétérozygotie (χ^2 = 0,07, ddl = 1, p = 0,8, n = 75). La viabilité quant à elle ne varie ni avec l'hétérozygotie (χ^2 = 0,37, ddl = 1, p = 0,54, n = 75) ni avec la catégorie (χ^2 = 0,13, ddl = 2, p = 0,94, n = 75, **Figure 22C**).

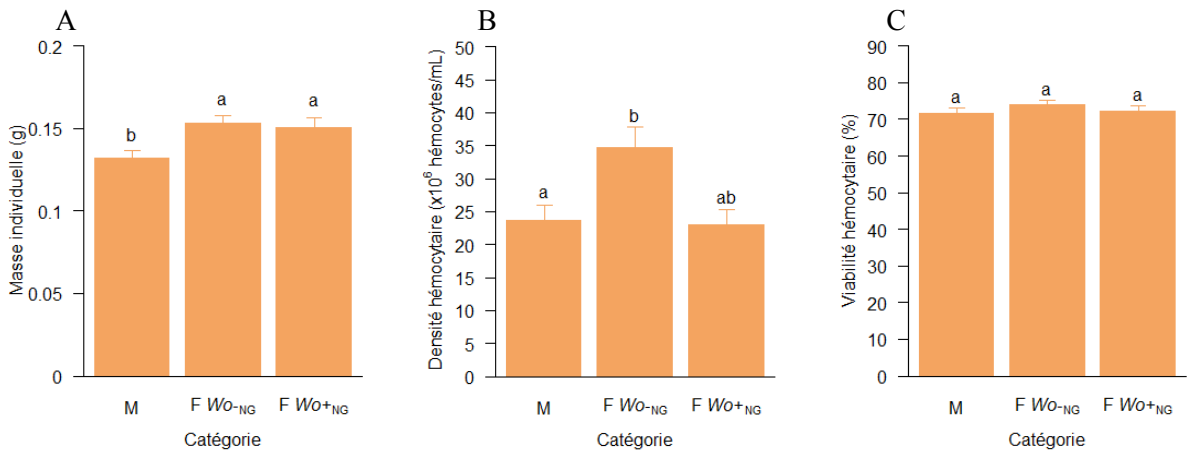

Figure 22 Paramètres mesurés avant l'injection pour l'expérience 2. (A) Masse. (B) Densité hémocytaire. (C) Viabilité hémocytaire.

b) Suivi de la survie des animaux infectés

Les animaux injectés avec *Salmonella* meurent significativement plus que les animaux témoins (χ^2 = 8,18, ddl = 1, p = 0,004, n = 88, **Figure 23**).

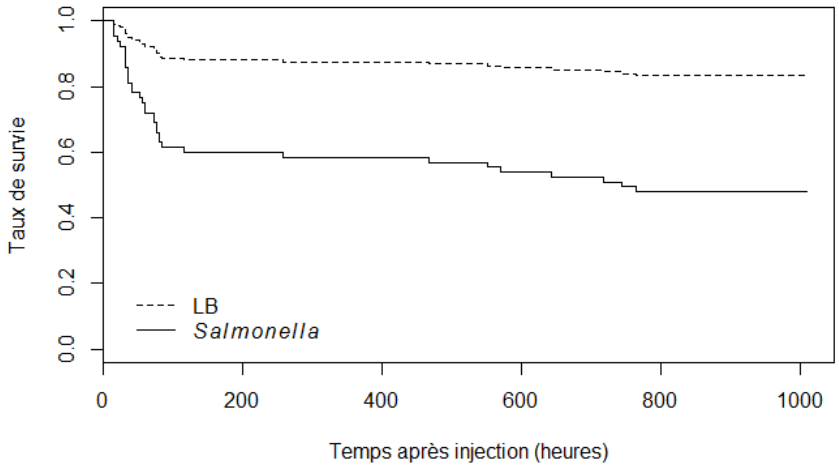

Figure 23 Effet du traitement sur la survie des animaux injectés.

Après une injection avec *Salmonella*, les animaux les plus hétérozygotes survivent mieux (χ^2 = 4,56, ddl = 1, p = 0,033, n = 55, **Figure 24A**). La catégorie conditionne également la survie des animaux (χ^2 = 6,95, ddl = 2, p = 0,030, n = 55, **Figure 24B**), avec aucune différence entre mâles et femelles *Wo*-$_{NG}$, mais les femelles *Wo*+$_{NG}$ survivent mieux que les mâles et ont tendance à survivre mieux que les femelles *Wo*-$_{NG}$ (p = 0,08).

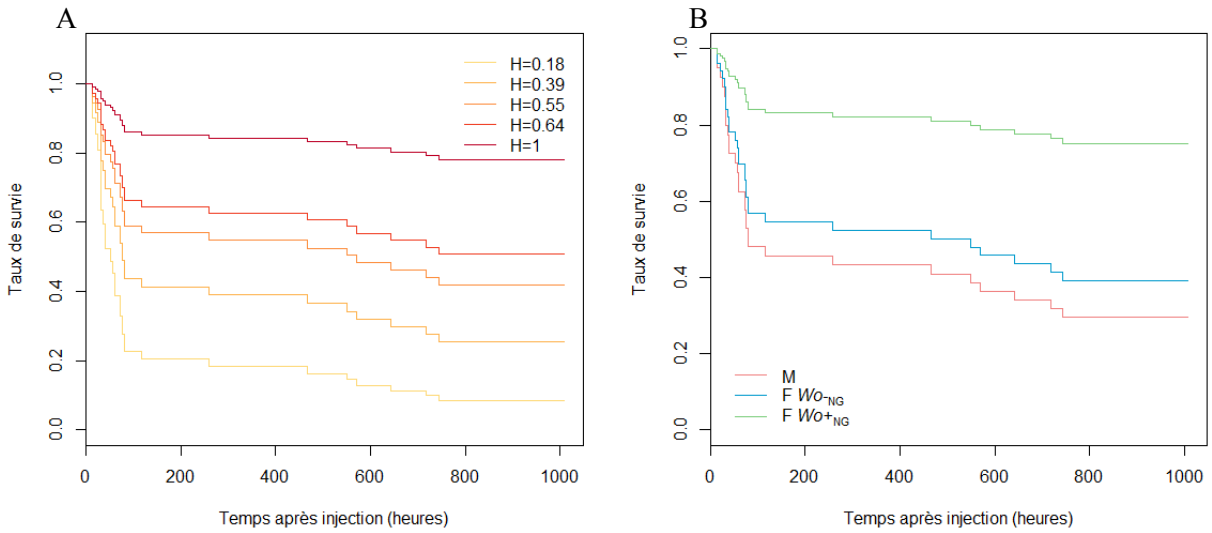

Figure 24 Survie des animaux injectés avec *Salmonella* selon (A) l'hétérozygotie et (B) la catégorie. Dans un but illustratif, la survie a été représentée pour (A) des femelles *Wo*-$_{NG}$ ou (B) une hétérozygotie de 0,53, valeur d'hétérozygotie moyenne dans ce jeu de données.

IV. Discussion

1) Une densité hémocytaire hautement variable

En premier lieu, il convient de noter que les niveaux de densité hémocytaire observés à J0 sont variables entre les deux expériences de cette étude, mais également par rapport à la littérature. En effet, la densité hémocytaire chez les animaux d'un an avait été montrée comme plus importante chez les mâles que chez les femelles symbiotiques et asymbiotiques non gravides (Sicard *et al.*, 2010), ce qui n'est pas observé dans l'expérience 1. Le fait que les résultats de Sicard *et al.* (2010) concernent la densité d'hémocytes vivants, et non la densité totale comme ici, ne suffit pas à expliquer ces différences : nos résultats restent en effet les mêmes si nous analysons la densité d'hémocytes vivants (résultats non présentés). Une autre possibilité implique la temporalité de nos mesures, puisque nos mâles ont été mesurés en mars 2016 et nos femelles non gravides en janvier 2017. Outre un effet de l'année, pouvant résulter des conditions générales de croissance et maintien des individus (luminosité, température, qualité/quantité de nourriture…) différant potentiellement entre 2016 et 2017, il faut tenir compte de la saison. Nos femelles non gravides ont été mesurées avant la période de reproduction, alors que nos mâles ainsi que les individus de Sicard *et al.* (2010) ont été mesurés plus tard au mois de

mars, ce qui pourrait avoir une influence sur la physiologie des animaux via une modification de la quantité de ressources allouées à l'immunité selon la période de l'année.

Les données de l'expérience 2 sont également différentes, ce qui rend l'hypothèse précédente d'autant plus plausible. Cette fois-ci, les trois catégories sont étudiées en même temps en janvier, et nous retrouvons le résultat inverse de Sicard *et al.* (2010), à savoir une densité hémocytaire significativement plus faible pour les mâles. Cette observation va dans le même sens que les résultats d'une étude pilote réalisée en novembre 2015 (annexe 5). Cela suggère que les femelles investiraient plus dans la production hémocytaire que les mâles en période de repos sexuel, et moins en période de reproduction. Nous pouvons également remarquer que même au sein d'une catégorie, il existe une forte variabilité interindividuelle. Le cycle de mue est connu pour influencer le taux d'hémocytes chez un autre isopode terrestre, *Porcellio dilatatus* (Coutant, 1977), cependant la majorité des variations se produit autour de la mue, période en dehors de laquelle se trouvaient nos individus. La densité hémocytaire semble donc être un paramètre extrêmement variable, et nécessitera d'autres études afin de confirmer ou infirmer la variation saisonnière entre les sexes que nous observons.

2) Des effets de l'injection partagés par tous les individus

La densité et la viabilité hémocytaires ne varient pas de la même façon selon la solution injectée. En effet, seule l'injection de *Salmonella* conduit à une chute du taux d'hémocytes, témoin de l'investissement des hémocytes dans la lutte du système immunitaire contre le pathogène (Söderhäll *et al.*, 2003; Sricharoen *et al.*, 2005), ce qui confirme que l'injection de LB a bien été réalisée en conditions stériles. La viabilité quant à elle augmente avec l'injection de LB, ce que l'on peut expliquer par une production d'hémocytes accrue suite à la piqure. En effet, des hémocytes sont rapidement mobilisés au point d'injection pour colmater l'ouverture via la coagulation (Theopold *et al.*, 2004). L'organisme doit alors compenser cette perte d'hémocytes, et de nouvelles cellules sont rapidement produites par les organes hématopoïétiques (Söderhäll *et al.*, 2003). Ces cellules plus jeunes pourraient alors être plus robustes et moins susceptibles de mourir au moment du prélèvement, ce qui explique que le taux de viabilité hémocytaire soit plus important juste après une injection de

LB. Cependant, cette hausse de viabilité ne s'observe pas chez les animaux injectés avec *Salmonella*. Les hémocytes sont en effet détruits lors de la lutte contre la bactérie, ce qui a pour conséquence évidente de diminuer la viabilité hémocytaire. La stabilité de viabilité hémocytaire après injection de *Salmonella* résulterait donc d'un équilibre entre robustesse des hémocytes récemment produits et mortalité induite par la lutte contre l'infection.

La densité hémocytaire après une injection de *Salmonella* ne diffère pas significativement entre les cinq catégories. Ce niveau commun pourrait être représentatif d'un équilibre entre taux d'hématopoïèse (actuellement inconnu chez le cloporte) et destruction régulière des hémocytes suite à l'infection, qui seraient similaires pour toutes les catégories. Malgré l'absence de différence significative de densité hémocytaire entre les catégories, des variations interindividuelles existent, et sont d'autant plus intéressantes qu'une plus forte densité hémocytaire prédit une charge bactérienne plus faible. Ainsi, un nombre plus important d'hémocytes pourrait conférer une meilleure résistance, mais les mécanismes responsables des variations de densité hémocytaire restent inconnus. Les individus pourraient par exemple différer dans leur taux d'hématopoïèse. Il ne faut pas non plus perdre de vue que nous n'avons mesuré ici que la densité hémocytaire totale sans quantifier les différents types hémocytaires, dont l'efficacité pourrait également être responsable de la résistance aux pathogènes.

3) Gravidité : aucun impact ou artefact statistique ?

C'est pour étudier l'effet de la gravidité que la corrélation entre bloc et catégorie, évoquée en fin de matériel et méthodes, impose le plus de précautions pour discuter des résultats. En effet, les mesures faites chez les femelles gravides semblent relativement éloignées de celles chez les femelles non gravides, comme par exemple la densité hémocytaire semblant plus faible pour les femelles gravides (**Figure 16A**, **Figure 20A**), ou la charge bactérienne apparaissant plus élevée (**Figure 21A**). Pour autant, aucune différence significative n'est jamais observée entre ces deux types de femelles. . Ainsi, cette différence (apparente) entre femelles gravides et autres catégories pourrait être gommée

par l'utilisation des effets aléatoires dans le modèle, nous rendant incapables de déterminer si elle résulte bien d'un effet aléatoire ou au contraire d'un effet biologique indétectable par notre approche statistique.

Quoiqu'il en soit, il est raisonnable de penser que le système immunitaire puisse être affecté par la gravidité, comme c'est le cas chez les vertébrés (Weetman, 1999). Après une injection de *Salmonella*, les femelles non gravides sont les seules à voir leur viabilité hémocytaire augmenter, ce qui conduit à proposer que les femelles non gravides de 2017 pourraient être plus immunocompétentes et aient moins besoin de mobiliser leurs hémocytes, que ce soit dû au statut de gravidité ou bien à la période de l'année.

Dans les deux cas, ces femelles non gravides pourraient avoir besoin d'investir moins d'hémocytes dans la lutte et ainsi subir une moindre mortalité hémocytaire, ce qui est cohérent avec leur densité hémocytaire semblant supérieure à celle des femelles gravides. Ceci est à mettre en parallèle avec la charge en *Salmonella* qui semble légèrement inférieure pour les femelles non gravides, confirmant l'idée qu'elles sont plus résistantes. S'il nous est impossible de conclure sur la significativité de ces différences, les tendances observées sur les différents paramètres immunitaires mesurés sont cohérentes entre elles. Partant de ce principe, il est tentant d'imaginer que des expériences de survie sur ces deux types de femelles, gravides ou non, auraient abouti à une meilleure survie des femelles non gravides par rapport aux femelles gravides.

4) Symbiose avec *Wolbachia* : une protection confirmée

Les femelles asymbiotiques ont une masse plus importante que les femelles symbiotiques en cas de gravidité, mais pas hors gravidité. Cependant, ceci ne reflète probablement pas un effet de la gravidité, relatif au nombre d'œufs pondus par exemple, mais plutôt un effet de l'année. En effet, nous avons constaté que les femelles symbiotiques disponibles en 2016 étaient bien plus petites que les asymbiotiques, ce qui n'était pas le cas en 2017. Il est possible que des conditions d'élevage

particulières (plus forte densité d'individus, moindre quantité de nourriture…) plutôt qu'un effet biologique aient conduit à la petite taille, et donc masse, des femelles symbiotiques de 2016.

L'expérience 2 a permis de reproduire des résultats déjà connus : *Wolbachia* confère une protection contre *Salmonella* à son hôte qui se traduit par une meilleure survie des femelles symbiotiques (Braquart-Varnier *et al.*, 2015). Si nous avons observé seulement une tendance des femelles symbiotiques à survivre mieux que les femelles asymbiotiques, l'avantage de survie des femelles symbiotiques par rapport aux mâles s'avère significative, ce qui n'avait jusqu'à présent jamais été testé chez les cloportes hébergeant une souche de *Wolbachia* féminisante. Un apport intéressant de notre étude est également l'effet positif de *Wolbachia* sur la viabilité hémocytaire, puisque les cellules sont moins viables chez les mâles que chez les femelles symbiotiques gravides, avec des résultats intermédiaires pour les femelles symbiotiques non gravides et les femelles asymbiotiques. Un travail de thèse réalisé par F. Chevalier (2011) a mis en évidence que la proportion d'hémocytes apoptotiques était moins importante chez les femelles symbiotiques que les femelles asymbiotiques. Une capacité de *Wolbachia* à diminuer la susceptibilité des hémocytes à l'apoptose pourrait alors être responsable de leur meilleure viabilité, et pourrait être adaptative face à d'autres infections pathogènes, de par la présence au sein même de ces cellules de cet endosymbionte qui infecte 40% des hémocytes (Chevalier *et al.*, 2011).

5) Effet de l'hétérozygotie

Divers effets de la diversité individuelle sur le phénotype des animaux ont pu être mis en évidence dans cette étude. En premier lieu, les individus plus hétérozygotes présentent une masse plus importante dans l'expérience 1 mais pas dans l'expérience 2, ce qui n'est pas surprenant au vu de la valeur non significative de g_2 pour cette dernière. L'effet de l'hétérozygotie est faible, comme prédit par la théorie, mais confirme la tendance observée dans la partie A du chapitre III. En revanche, nous n'avons pas observé d'impact de l'hétérozygotie sur les paramètres cellulaires mesurés. En particulier, la corrélation négative entre hétérozygotie et densité hémocytaire de l'étude pilote n'a pas été

confirmée par cette étude, possiblement du fait de la grande variabilité hémocytaire déjà évoquée ou de la saisonnalité (l'étude pilote ayant eu lieu en avril 2013). Cela dit, même si aucune corrélation négative significative n'a été retrouvée dans cette étude entre hétérozygotie et densité hémocytaire, nous pouvons constater que la charge bactérienne en *Salmonella* a tendance à augmenter avec l'hétérozygotie et diminue avec la densité hémocytaire, ce qui va finalement dans le même sens que l'étude pilote, même si cela est de façon indirecte : une faible densité hémocytaire est corrélée à une forte charge bactérienne, elle même ayant une tendance à être liée à une forte hétérozygotie.

Il n'est pas non plus impossible que l'hétérozygotie impacte d'autres paramètres, qu'ils soient cellulaires ou humoraux. Par exemple, Carissan-Lloyd *et al.* (2004) ont mis en évidence chez la moule *Mytilus edulis* que l'hétérozygotie impactait les proportions des différents types hémocytaires, malgré une absence d'effet sur la densité hémocytaire totale. Par ailleurs, l'hétérozygotie pourrait impacter le coût de la défense immunitaire, plutôt que ses effecteurs. C'est notamment le cas chez la mésange charbonnière *Parus major*, où la défense contre des ectoparasites est plus coûteuse chez les individus les moins diversifiés (Voegeli *et al.*, 2013).

Quoiqu'il en soit, un autre résultat intéressant de cette étude est que l'hétérozygotie confère un avantage de survie face à *Salmonella*. Il faut rapprocher ce résultat de la tendance pour une corrélation positive entre hétérozygotie et charge en pathogène précédemment citée. Les hétérozygotes ne sont donc pas plus résistants puisqu'ils n'ont pas une charge bactérienne plus faible. En revanche, la tendance observée suggère que les hétérozygotes pourraient posséder une meilleure résistance, consistant à mieux supporter les conséquences de l'infection, par opposition à la résistance qui consiste à limiter la charge pathogène (Raberg *et al.*, 2007). Cette hypothèse a d'ailleurs déjà été évoquée chez le campagnol *Microtus montanus* où les individus plus hétérozygotes pour des marqueurs neutres possèdent plus d'endoparasites en population naturelle (Winternitz *et al.*, 2014). La meilleure survie des hétérozygotes pourrait également être conférée par un type hémocytaire particulier, ou encore par une masse plus importante relatant de meilleures conditions en termes de réserves énergétiques.

Finalement, l'impact de l'hétérozygotie sur le phénotype des individus ne dépend pas de la catégorie. Cela pourrait relever d'un manque de puissance de nos analyses pour détecter une interaction significative entre hétérozygotie et catégorie, notamment pour l'expérience 2 où la valeur de g_2 est faible. Alternativement, il est tout à fait possible que les pressions de sélection portant sur les paramètres concernés soient les mêmes pour tous les individus quel que soit leur sexe, statut de reproduction et statut symbiotique, et cela malgré des allocations visiblement différentes dans les paramètres immunitaires pour ces catégories.

V. Conclusion

Cette étude, assez exploratoire en ce qui concerne la gravidité, nous a permis d'accumuler des connaissances dans un autre contexte que les corrélations hétérozygotie - valeur sélective. Nous avons également pu souligner l'extrême variabilité de la densité hémocytaire chez le cloporte, que ce soit entre les années, les saisons mais aussi entre les individus. Il semble donc important de réaliser d'autres travaux afin d'éviter les biais dans de futures expérimentations portant sur des animaux qui ne peuvent pas forcément être standardisés. Ainsi, un suivi plus précis de l'évolution de la densité hémocytaire au cours de l'année, voire au cours d'une journée, permettrait de caractériser plus finement ces variations et de mieux mettre en perspective nos résultats.

Les résultats obtenus au cours de ces manipulations ont cependant permis de confirmer l'existence d'un lien entre hétérozygotie et une mesure morphométrique des individus, mais aussi de découvrir une corrélation entre hétérozygotie et survie face à *Salmonella* inédite chez le cloporte, ce qui laisse soupçonner une meilleure tolérance pour les individus les plus diversifiés. Une étude des différents types hémocytaires, par exemple en étudiant leurs proportions respectives par cytométrie de flux (Chevalier *et al.*, 2011), pourrait apporter de nouvelles informations sur l'action de l'hétérozygotie sur le système immunitaire.

D.Conclusion du chapitre III

Les deux études présentées dans ce chapitre III nous confortent dans l'étude des HFC chez *A. vulgare*. Tout d'abord, l'hétérozygotie semble avoir une influence positive sur les caractères morphométriques du cloporte : une tendance positive est observée sur la taille des femelles dans la première étude, tandis qu'un effet significatif, même s'il est faible, est observé sur la masse de chaque sexe dans la deuxième. De plus, l'hétérozygotie confère également une meilleure survie face au pathogène *Salmonella*, possiblement via une meilleure tolérance pour la bactérie. Le cloporte étant susceptible de rencontrer *Salmonella* dans son milieu de vie puisqu'elle est présente dans les sols, l'hétérozygotie pourrait permettre d'augmenter la longévité des individus et accéder à plus d'évènements de reproduction, facteur important dans le succès reproducteur à vie. L'ensemble de ces résultats sera discutée plus en profondeur dans la discussion générale afin d'en faire le lien avec les chapitres précédents.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de la diversité génétique individuelle sur différentes caractéristiques de l'isopode terrestre *A. vulgare*. L'objectif était double : d'une part, nous avons cherché à caractériser les processus de sélection sexuelle en relation avec la diversité génétique, et d'autre part nous avons souhaité déterminer l'effet de l'hétérozygotie sur la valeur sélective des animaux en recherchant des HFC. Différents résultats marquants ont été obtenus et sont récapitulés dans la **Figure 25**. L'hétérozygotie semble ainsi conférer une meilleure survie face à un pathogène (chapitre III partie C) ainsi qu'une taille plus importante (chapitre III parties B et C), ce dernier caractère étant particulièrement important chez les femelles puisqu'il est lié à une meilleure fécondité (chapitre III partie B). D'autre part, les mâles les plus hétérozygotes obtiennent un meilleur succès reproducteur (chapitre I parties C et D, chapitre II partie C), bien que le processus sous-jacent soit encore à ce jour indéterminé. Un choix pour un partenaire dissimilaire a également été observé de la part des mâles comme de celle des femelles (chapitre I parties B et C), ce choix n'étant pas systématique mais dépendant des conditions dans lesquelles se trouvent les animaux (gamme de femelles disponibles ou nombre de pères dans les portées). Enfin, nous avons pu détecter d'importants taux de paternité multiple, à la fois en population naturelle et en laboratoire (chapitre II parties B et C), ce qui a vraisemblablement des implications sur la diversité génétique des populations. Ces différents aspects sont discutés en détail ci-après.

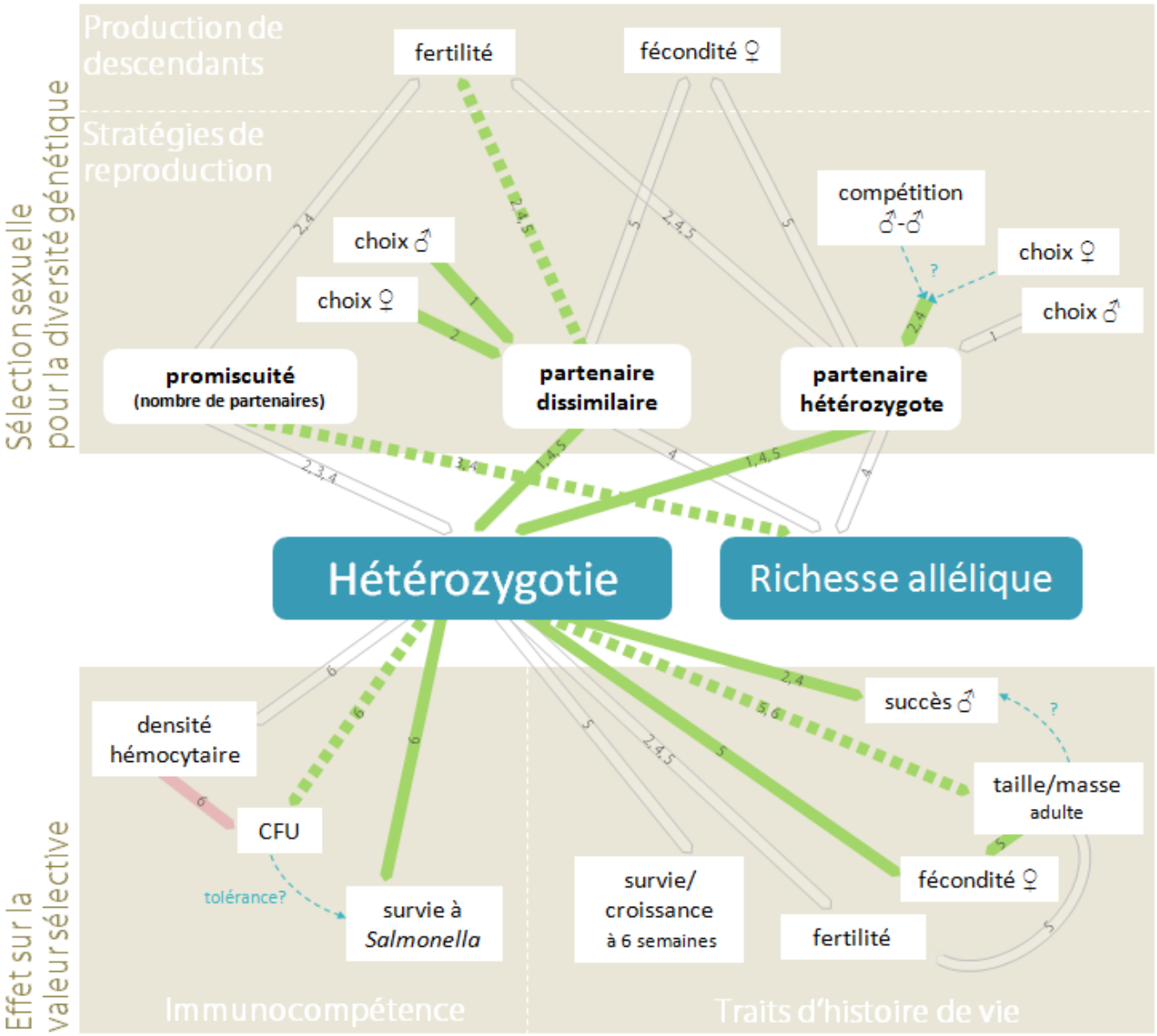

Figure 25 Synthèse de l'impact de la diversité génétique sur la biologie du cloporte *A. vulgare* à partir des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Les flèches épaisses indiquent les effets que nous avons testés, avec les flèches translucides traduisant une absence d'effet significatif, les flèches vertes un effet positif et la flèche rouge un effet négatif. Les flèches épaisses vertes en pointillés indiquent des effets que nous supposons être positifs, mais pour lesquels soit nous n'avons observé qu'une tendance, soit l'effet significatif n'a pas été observé au cours de l'intégralité des études portant sur cette relation. Les flèches bleues en pointillé représentent des relations hypothétiques issues de notre réflexion. Les chiffres dans les flèches correspondent aux différentes études réalisées, 1 : préférence mâle dans test en Y (chapitre I partie B) ; 2 : succès de paternité des mâles (chapitre I partie C) ; 3 : paternité multiple en population naturelle (chapitre II partie B) ; 4 : sex-ratio et stratégies d'appariement (chapitre II partie C) ; 5 : qualité de descendants consanguins ou non (chapitre III partie B) ; 6 : hétérozygotie et immunité (chapitre III partie C).

A. L'hétérozygotie est liée à la valeur sélective chez *A. vulgare*

I. Immunocompétence

Nos travaux ont permis la mise en évidence chez *A. vulgare* d'un effet positif de l'hétérozygotie des animaux sur leur survie lorsqu'une solution de *Salmonella* leur est injectée. *Salmonella typhimurium* est une bactérie pathogène que les cloportes sont susceptibles de rencontrer en milieu naturel puisqu'elle est naturellement présente dans les sols. Or, il se trouve que les individus les plus hétérozygotes présentent plus de bactéries circulantes au sein de leur hémolymphe 24 h après une injection comparé aux individus moins hétérozygotes (chapitre III partie C). Cette relation suggère que les individus les plus hétérozygotes survivraient mieux à *Salmonella* par un phénomène de tolérance, et non de résistance. Les hétérozygotes parviendraient alors à limiter l'impact du pathogène sur leur santé, par exemple en limitant les dommages causés sur l'organisme par l'action du système immunitaire (Ayres & Schneider, 2008). Des animaux plus tolérants pourraient ainsi survivre plus longtemps, avantage vraisemblablement important pour *A. vulgare* qui est un animal longévif et qui pourrait, par cette meilleure survie, augmenter le nombre d'évènements de reproduction au cours de sa vie.

II. Morphométrie

Les paramètres morphométriques que sont la taille ou la masse des individus, deux paramètres intimement liés, ont également été étudiés. Nous avons ainsi observé une tendance de corrélation positive entre hétérozygotie et taille des femelles dans le chapitre III partie B (tendance vraisemblablement due au faible effectif utilisé), et une corrélation positive significative entre hétérozygotie et masse dans le chapitre III partie C. Ces mesures revêtent une certaine importance chez le cloporte. En effet, la littérature démontre un lien entre la taille des femelles et leur fécondité chez divers isopodes terrestres (Sutton *et al.*, 1984), y compris chez *A. vulgare* (Moreau, 2001), relation que nous retrouvons dans nos travaux, avec des femelles hétérozygotes (de taille plus

importante) produisant plus d'œufs (chapitre III partie B). D'autre part, des travaux de Brody *et al.* (1983) indiquent qu'en conditions de stress hydrique et thermique (froid), les femelles les plus grosses survivent mieux chez cette espèce. De par leur longévité, les cloportes sont susceptibles de rencontrer plusieurs fois des conditions de sécheresse et de basse température au cours des années, à l'origine d'évènements de mortalité impliquant une potentielle sélection sur la taille des animaux. Ainsi, l'effet de l'hétérozygotie sur la valeur sélective mériterait d'être étudié en situation de stress. Survie et fécondité étant des composantes majeures du succès reproducteur des individus, les femelles hétérozygotes présenteraient alors un avantage sélectif de par leur taille plus importante, même si nous n'avons pas observé plus de descendants par portée pour les femelles hétérozygotes (chapitre I partie C, chapitre II partie C). Une estimation du succès reproducteur sur l'ensemble de la vie des femelles permettrait de déterminer si les femelles plus hétérozygotes produisent effectivement un plus grand nombre de descendants. Par ailleurs, une taille plus importante pourrait être à l'origine du plus grand succès des mâles hétérozygotes observé dans les chapitres I et II de ce manuscrit (cf. Discussion générale partie B).

III. Investigations à mener

Différentes possibilités permettraient d'approfondir l'étude des HFC chez le cloporte commun. Tout d'abord, les HFC émergent souvent en situation de stress pour les individus (Da Silva *et al.*, 2006; Fox & Reed, 2011; Annavi *et al.*, 2014). Effectuer des mesures de traits liés à la valeur sélective sous des conditions de stress, qu'il soit thermique, hydrique, nutritionnel ou infectieux par exemple, pourrait mettre en évidence certaines HFC, comme nous l'avons déjà suggéré au cours du chapitre III. Par ailleurs, utilisant systématiquement l'hétérozygotie moyennée sur plusieurs loci, notre approche s'est focalisée sur la détection de HFC sous l'hypothèse de l'effet général, selon laquelle l'hétérozygotie aux marqueurs fonctionnels serait corrélée à celle du génome dans son ensemble et notamment aux marqueurs moléculaires neutres. Par contre, nous n'avons pas testé la présence d'effet local. Pour ce faire, diverses études ont recherché une association entre le trait mesuré et l'hétérozygotie pour chacun des loci un à un. Cependant, cette approche a récemment été critiquée par

Szulkin *et al.* (2010). Ces auteurs soulignent également que l'effet local est vraisemblablement très difficile à détecter même testé de façon approprié, d'autant plus si la corrélation entre hétérozygotie multilocus et trait de valeur sélective est faible.

Par ailleurs, le développement en cours de marqueurs SNP permettra d'affiner nos connaissances avec une hétérozygotie calculée sur un grand nombre de marqueurs (potentiellement fonctionnels), et donc potentiellement plus représentative de l'hétérozygotie globale du génome.

B. La sélection sexuelle, une affaire de diversité génétique

I. Les mâles hétérozygotes ont un meilleur succès

Les différentes études dans lesquelles plusieurs mâles ont été proposés de façon expérimentale à des femelles, ont révélé que les mâles les plus hétérozygotes ont un meilleur succès que les mâles les moins hétérozygotes, avec toutefois quelques différences selon l'étude. Ainsi, dans le chapitre I partie C, le mâle engendrant la plus grande proportion de descendants parmi les deux mâles proposés à la femelle est le plus hétérozygote des deux (Durand *et al.*, 2017). Ce phénomène est notamment observé quand les deux mâles produisent des descendants. Il pourrait ainsi résulter d'un choix cryptique de la part de la femelle, biaisant la paternité en faveur du mâle le plus hétérozygote.

Une autre possibilité concerne la compétition spermatique entre mâles. Les mâles plus hétérozygotes pourraient être plus performants en produisant des spermatozoïdes de meilleure qualité, comme chez le branchiopode *Eulimnia texana* (Weeks *et al.*, 2009) et ainsi obtenir un meilleur succès de fécondation. On pourrait également supposer que les mâles plus hétérozygotes transfèreraient plus de spermatozoïdes à la femelle, ce qui leur donnerait un avantage au cours de la compétition spermatique. Les travaux de thèse de F. Lefebvre (2002) ont mis en évidence que plus l'accouplement dure longtemps, plus le nombre de spermatozoïdes inséminés augmente. Une possibilité serait que les mâles hétérozygotes, qui s'avèrent aussi être plus gros, arriveraient mieux à maintenir la femelle et

pourraient donc faire durer l'accouplement plus longtemps. Cela serait cohérent avec le fait que les mâles plus gros ont une durée de copulation plus longue (Lefebvre, 2002).

Notons toutefois que nous ne retrouvons pas cet effet de l'hétérozygotie des mâles sur la proportion de *pulli* engendrés au sein de chaque portée à laquelle ils ont contribué dans notre étude sur le sex-ratio et les stratégies d'appariement présentée au chapitre II partie C. Cela n'implique pas pour autant une absence de choix cryptique ou de compétition spermatique en faveur des mâles plus hétérozygotes : en effet, dans cette dernière étude, l'analyse n'a pas permis d'apparier statistiquement (c'est-à-dire de comparer entre eux) les mâles présentés à une même femelle contrairement au chapitre I partie C, ce qui peut expliquer les résultats différents. De plus, les pères étaient plus nombreux dans les portées dans le chapitre II partie C que dans le chapitre I partie C, ainsi le nombre de *pulli* génotypés n'était peut-être pas suffisant pour estimer avec précision la contribution réelle de chaque père au sein des portées.

En revanche, nos deux études s'accordent sur le fait que les mâles les plus hétérozygotes ont un meilleur accès à la paternité. Là encore, nous ne pouvons pas exclure que les femelles choisissent de s'accoupler préférentiellement avec des mâles hétérozygotes, ou bien d'empêcher la fécondation de leurs ovocytes par les mâles moins hétérozygotes à travers un choix cryptique. D'autre part, l'hypothèse selon laquelle les mâles plus hétérozygotes auraient une meilleure performance dans la compétition mâle-mâle est tentante. Bien que des comportements agressifs entre mâles conditionnant l'accès aux femelles existent chez certains Oniscidea tels que *Porcellionides pruinosus*, ces comportements ne sont pas présents chez *A. vulgare* (Lefebvre, 2002). Cependant, les femelles chez *A. vulgare* semblent systématiquement résister aux tentatives d'accouplement, ce qui aurait pour conséquence de sélectionner les mâles plus gros capables de surmonter cette résistance (Lefebvre, 2002). Il est par ailleurs suggéré que la probabilité d'accouplement augmente avec la taille du mâle chez *A. vulgare* (Lefebvre, 2002). La plus grande taille des mâles hétérozygotes pourrait alors leur conférer un avantage, mais il faut cependant rester prudent sur ce point : la variance en taille entre les mâles les moins et les plus hétérozygotes pourrait ne pas être suffisante pour générer des différences dans les capacités de ces mâles à contraindre les femelles à l'accouplement.

II. Choix pour la dissimilarité génétique : un tableau complexe

Quand une femelle a la possibilité de se reproduire avec deux mâles, un avantage reproducteur du mâle le plus dissimilaire n'est observé que quand la portée ne comporte qu'un seul père (Durand *et al.*, 2017). Des analyses complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre ce résultat : nous ignorons en effet si les cas de monopolisation de la paternité résultent d'un seul accouplement entre la femelle et un des deux mâles proposés, et donc d'un choix pré-copulatoire, ou bien d'un choix cryptique faisant suite à une insémination par les deux mâles. Dans ce dernier cas, les femelles pourraient par exemple ne pas réaliser le transfert des spermatozoïdes d'un des deux mâles vers la spermathèque, empêchant ainsi la paternité de ce mâle, la fécondation semblant avoir lieu lors du passage des ovocytes au sein des spermatozoïdes stockés (Ziegler & Suzuki, 2011). L'observation directe de la séquence copulatoire ou le génotypage des spermatozoïdes contenus au sein de la spermathèque pourraient nous aider à mieux comprendre les causes de ce résultat.

Nous avons également observé un choix mâle pour la dissimilarité conditionné par une large différence sur ce paramètre entre les deux femelles proposées (Durand *et al.*, 2015). Cependant, ce choix est perturbé lorsque les deux femelles présentent un important écart dans leur hétérozygotie, ce qui pourrait être expliqué par les observations réalisées dans le chapitre III partie B. En effet, nous pourrions établir le profil génétique de la partenaire idéale pour un mâle chez *A. vulgare* : une telle femelle devrait être à la fois hétérozygote (présentant donc une meilleure fécondité) et génétiquement dissimilaire au mâle (permettant d'optimiser la fertilité du couple, cf. chapitre I partie C). Les femelles remplissant ces deux critères pourraient être rares : les mâles devraient donc réaliser un compromis entre dissimilarité et hétérozygotie. Or, seule la similarité génétique impacte le nombre de descendants produits par le couple (chapitre I partie C), ce qui expliquerait pourquoi nous observons principalement une préférence mâle pour les femelles dissimilaires et non pour les femelles hétérozygotes. Cependant, si les deux femelles présentent un écart important d'hétérozygotie et que la femelle la plus dissimilaire (optimisant la fertilité du couple) ne correspond pas à la plus hétérozygote (plus féconde), le mâle pourrait avoir des difficultés à choisir, et le choix mâle ne serait plus systématiquement en faveur de la dissimilarité comme nous avons pu l'observer. D'autres travaux

devront être effectués afin de caractériser plus finement la préférence mâle, et il serait en particulier nécessaire de mettre en place des protocoles permettant aux mâles de s'accoupler avec les femelles proposées pour confirmer que la préférence dans les tests en Y correspond bien à une préférence sexuelle et pas simplement à une préférence sociale. L'investissement reproducteur de chaque mâle dans l'accouplement en fonction des caractéristiques génétiques des femelles pourrait également être étudié, par exemple en estimant la quantité de spermatozoïdes transférés à chaque accouplement.

III. Valeur adaptative et conséquences évolutives des processus de sélection sexuelle concernant les caractéristiques génétiques

Dans le chapitre I partie B, nous avons montré par simulation que pour notre jeu de marqueurs moléculaires, l'hétérozygotie des descendants augmente avec la dissimilarité génétique de leurs parents ainsi que leur hétérozygotie, en adéquation avec la littérature (Mitton *et al.*, 1993; Fromhage *et al.*, 2009). Ces corrélations ont par la suite été confirmées de façon expérimentale (chapitre II partie C et III partie B). Ainsi, le choix pour un partenaire dissimilaire observé chez les deux sexes, voire pour un partenaire hétérozygote chez les femelles, constitue vraisemblablement une stratégie d'optimisation de l'hétérozygotie des descendants, ces derniers étant en conséquence de meilleure qualité au vu des HFC que nous avons pu observer. Produire des descendants plus hétérozygotes revient alors à générer des descendants plus gros et survivant mieux à des infections, ainsi que des fils ayant un meilleur succès reproducteur et des filles plus fécondes.

De plus, il est largement admis qu'une forte similarité génétique entre parents a pour conséquence de diminuer le nombre de descendants, comme observé dans de nombreux taxa (Kempenaers, 2007). Nous avons d'ailleurs pu observer cette relation chez le cloporte, mais pas au cours de toutes nos études. Si l'effet est significatif dans le chapitre I partie C (Durand *et al.*, 2017), nous n'observons qu'une tendance dans le chapitre III partie B, probablement liée au faible effectif que nous avons utilisé. Enfin, lorsque nous avons permis aux femelles de s'accoupler avec un grand nombre de mâles (chapitre II partie C), nous n'avons pas observé de corrélation entre la taille de

chaque portée et la similarité moyenne entre la mère et tous les pères représentés dans la portée. Or dans cette expérience, les pères étaient nombreux, ainsi le nombre de descendants dépendrait non seulement de la fécondité de la femelle, mais également de la similarité de chaque père avec la femelle, combinée avec la proportion d'œufs que chacun de ces mâles a fécondée. Pour observer un effet de la similarité entre parents sur la taille de portée, il faudrait pouvoir pondérer la moyenne de similarité mère-pères par la contribution exacte de chaque père à la portée. Notre protocole ne nous permet pas d'accéder à ce dernier paramètre avec précision au vu du grand nombre de pères et de l'effectif limité de descendants que nous avons pu analyser dans chaque portée. Il n'est donc pas surprenant de ne pas observer d'effet de la similarité moyenne des pères à la femelle sur la taille de la portée.

Quoiqu'il en soit, nous avons pu observer un choix de la part des deux sexes au cours de nos travaux. Cela correspond avec les hypothèses que nous avions posées en chapitre I partie A en ce qui concerne notre modèle : on s'attend à ce que les femelles effectuent un choix de par leur fort investissement dans la reproduction, mais au vu des fréquents biais-de sex-ratio en faveur des femelles dans les populations naturelles, en particulier en présence de *Wolbachia*, les mâles pourraient développer des capacités de choix puisqu'ils deviennent le sexe rare. Nos observations confirment donc que le choix de partenaire est mutuel chez *A. vulgare*, comme observé chez d'autres modèles arthropodes tels que la blatte *Blatella germanica* (Lihoreau *et al.*, 2008).

C.De forts taux de paternité multiple chez *A. vulgare*

Au cours de nos travaux, nous avons pu observer un fort taux de paternité multiple en population naturelle comme en population expérimentale. Jusqu'à cinq accouplements peuvent avoir lieu au sein d'une seule intermue (chapitre II partie C), et ce malgré la présence d'une période réfractaire chez les femelles dans les heures suivant un premier accouplement (Moreau *et al.*, 2002). Nos observations suggèrent donc que cette période réfractaire serait de courte durée, ne dépassant pas quelques jours, et ne serait donc pas un frein à l'accouplement multiple.

I. Valeur adaptative

Etant donné qu'un seul accouplement peut servir à féconder des portées pendant au moins un an grâce aux spermatozoïdes emmagasinés dans la spermathèque chez *A. vulgare*, la question de la valeur adaptative en lien avec un taux de paternité multiple important (pour toutes les femelles échantillonnées, avec en moyenne plus de quatre pères par portée en population naturelle) mérite d'être posée, en particulier au vu du nombre d'accouplements possible au cours d'une seule intermue. Classiquement, l'accouplement multiple peut s'expliquer par deux types de bénéfices, à savoir directs et indirects (Reynolds, 1996; Yasui, 1998).

1) Obtention de bénéfices directs…

L'hypothèse des bénéfices directs semble à première vue peu probable chez *A. vulgare* pour expliquer la paternité multiple. En effet, les mâles ne protègent aucun territoire, ne procurent aucun soin aux jeunes, et n'offrent aucun cadeau nuptial aux femelles, même si nous ne pouvons pas exclure que le sperme contienne des éléments nutritifs qui bénéficieraient à la femelle et à sa descendance. Chez certaines espèces d'Oniscidea de la famille des Halophilosciidae, une activité spermiophagique est observée dans les ovaires et la spermathèque, ce qui constituerait un apport nutritif important pour les femelles (Mazzei *et al.*, 2014). Cependant, aucun spermatozoïde en cours de digestion n'a jamais été observé lors des études en microscopie portant sur le système génital des femelles *A. vulgare* (Suzuki & Ziegler, 2005; Ziegler & Suzuki, 2011), faisant de la spermiophagie une explication peu probable pour l'accouplement multiple chez cette espèce.

L'accouplement multiple chez *A. vulgare* pourrait également être une réponse au harcèlement de la part des mâles, en particulier chez cette espèce grégaire où la densité locale peut dépasser 500 individus au mètre carré (Paris & Pitelka, 1962). De récents travaux sur notre modèle d'étude indiquent que des femelles sexuellement matures élevées pendant un an dans des conditions de sex-ratio fortement biaisées en faveur des mâles ont une moins bonne survie que celles élevées dans des conditions de sex-ratio biaisé en faveur des femelles (Fortin, 2016). Cela suggère que la présence de

mâles pourrait être coûteuse pour les femelles et ainsi, il serait plus intéressant pour les femelles de réaliser un compromis en acceptant l'accouplement plutôt que de résister. Cette hypothèse est notamment privilégiée pour expliquer la paternité multiple chez la tortue marine *Chelonia mydas* (Lee & Hays, 2004) ou le gerris *Aquarius remigris* (Watson et al., 1998).

2) … ou de bénéfices indirects ?

L'accouplement multiple pourrait permettre aux femelles d'optimiser la transmission de bons gènes aux descendants en favorisant la paternité pour les mâles de bonne qualité génétique. L'hypothèse de *trade-up* suggère que les femelles s'accouplent avec un mâle supplémentaire lorsque le précédent n'était pas de bonne qualité génétique (Yasui, 1998), afin d'assurer la transmission de bons gènes à au moins une partie de leur descendance. Si tel est le cas chez *A. vulgare*, cela signifie que même en milieu naturel, de nombreux accouplements peuvent être nécessaires avant de trouver un mâle de bonne qualité. L'accouplement multiple pourrait également permettre aux femelles de biaiser la paternité en faveur des mâles permettant de transmettre des bons gènes aux descendants à travers un choix cryptique. Enfin, l'accouplement multiple pourrait être un moyen pour les femelles de sélectionner les mâles en augmentant l'intensité de la compétition spermatique. Ainsi, les mâles produisant des spermatozoïdes compétitifs accèdent plus à la fécondation, assurant aux femelles de produire des fils eux aussi plus compétitifs si ce trait est héritable (*sexy-sperm hypothesis* (Curtsinger, 1991)). Une variante de cette hypothèse considère que la compétitivité dans la compétition spermatique est due à une plus grande viabilité générale des mâles. Là encore, si ces traits sont transmissibles, alors la femelle polyandre obtiendrait non seulement des descendants plus compétitifs, mais aussi plus viables (*good-sperm hypothesis* (Yasui, 1997)). Ces deux hypothèses sont particulièrement séduisantes chez *A. vulgare*, étant donné l'intensité de la compétition spermatique résultant d'un niveau d'accouplement multiple élevé (cf. Discussion générale partie C.II).

Les bénéfices indirects peuvent également se traduire par une augmentation de la diversité génétique de la descendance (Tregenza & Wedell, 2000). Au cours de cette thèse, nous n'avons pas

observé de corrélation entre le nombre de pères et l'hétérozygotie des portées (chapitre I partie C et chapitre II parties B et C). Ainsi, soit nous n'avons pas pu détecter un tel effet avec notre approche (par exemple parce que l'hétérozygotie des quelques *pulli* génotypés n'est pas représentative de celle de la portée), soit il n'existe pas de mécanismes post-copulatoires permettant de biaiser la paternité en faveur des mâles dont les descendants seraient plus hétérozygotes, mécanismes pourtant observés chez des arthropodes comme le grillon *Grillus bimaculatus* (Bretman *et al.*, 2004). Le génotypage de portées issues d'un seul père dans le chapitre II partie C pourrait nous permettre de vérifier ces hypothèses, en comparant l'hétérozygotie des portées à un seul père avec celle des portées à plusieurs pères. Des éléments de réponse pourraient aussi être apportés par la recherche d'un biais dans la contribution de chaque père en relation avec ses caractéristiques génétiques.

De surcroît, nous avons observé une augmentation de la richesse allélique des portées avec le nombre de pères dans cette même étude (chapitre II partie C). En effet, la reproduction avec deux mâles pourrait permettre de doubler la diversité génétique de la portée par rapport à un accouplement avec un seul mâle (Yasui, 1998). Augmenter la diversité allélique des portées permettrait d'augmenter la probabilité que certains jeunes puissent accéder à la reproduction. Une comparaison du succès reproducteur et de la survie dans diverses conditions expérimentales de portées avec différents niveaux de paternité serait un moyen de vérifier cette hypothèse chez *A. vulgare*.

3) Distinguer les deux types de bénéfices

Les deux types de bénéfices classiquement évoqués pour expliquer l'accouplement multiple par les femelles ont différentes implications sur l'identité des partenaires sexuels. En effet, on ne peut observer de bénéfices indirects que si les accouplements successifs se font avec des mâles différents (accouplement avec de multiples mâles), tandis que des bénéfices directs pourraient aussi être cumulés par l'accouplement répété avec un même mâle (accouplement multiple *per se*). Comparer, dans notre modèle d'étude, la propension des femelles à accepter un deuxième accouplement en leur proposant soit le même partenaire, soit un partenaire différent pourrait nous permettre de mieux comprendre les

bénéfices apportés par les accouplements multiples, d'autant plus qu'on ignore à l'heure actuelle si une même paire mâle-femelle peut s'accoupler plusieurs fois. De plus, comparer les portées issues de ce protocole, en termes quantitatif (nombre de descendants) et qualitatif (traits d'histoire de vie, survie…), serait très informatif. Newcomer *et al.* (1999) ont démontré de façon similaire que les femelles du pseudoscorpion *Cordylochernes scorpioides* obtenaient des bénéfices indirects en s'accouplant avec plusieurs mâles puisque les femelles ayant reçu deux spermatophores issus chacun d'un mâle différent produisent 32 % de descendants en plus que des femelles ayant reçu deux spermatophores du même mâle.

II. Conséquences évolutives de la paternité multiple

1) Compétition spermatique

L'accouplement des femelles avec plusieurs mâles a pour conséquence la présence simultanée du sperme de différents mâles au sein du système génital des femelles, c'est-à-dire non seulement dans l'oviducte où il est déposé lors de l'insémination, mais également au sein de la spermathèque où il est stocké pendant plusieurs mois. Ces éléments suggèrent une intense compétition spermatique, chaque mâle tentant de maximiser la fécondation des ovocytes de la femelle par ses propres spermatozoïdes. La fécondation ayant apparemment lieu au sein de la spermathèque (en tout cas chez *A. vulgare* (Ziegler & Suzuki, 2011)), le succès des mâles pourrait être déterminé par la capacité de leurs spermatozoïdes à être transférés vers la spermathèque. Chez les Oniscidea, les spermatozoïdes ne sont pas motiles (Cotelli *et al.*, 1976) et le transfert d'une faible proportion des spermatozoïdes inséminés vers la spermathèque est vraisemblablement contrôlé par la femelle selon des modalités actuellement inconnues (Ziegler & Suzuki, 2011). Si ce transfert dépend de la proportion de chaque éjaculat dans l'oviducte, alors l'importante quantité de spermatozoïdes dans les éjaculats (Moreau *et al.*, 2001) reflèterait la compétition entre mâles pour l'accès à la spermathèque.

2) Diversité et maintien des populations

La forte capacité copulatoire des femelles pourrait permettre d'augmenter le nombre de mâles accédant à la reproduction au sein d'une population. Les mâles possédant également une forte capacité de copulation, comme cela est indiqué dans la littérature (Rigaud & Moreau, 2004) et confirmé par nos travaux (chapitre II partie B), nos observations confirment un système d'appariement promiscuitaire chez *A. vulgare*. Ce système, conférant de nombreuses opportunités de reproduction aux individus des deux sexes, pourrait permettre d'augmenter la taille efficace et donc limiterait la sensibilité de cette espèce à la dérive génétique. Cet effet est d'autant plus notable que des biais de sex-ratio sont régulièrement observés dans les populations chez *A. vulgare* en raison de la présence de *distorters* de sex-ratio (d'origine parasite et/ou génétique), biais pouvant conduire à une baisse de taille efficace. L'appariement multiple des femelles confèrerait ainsi aux populations une meilleure viabilité et un moindre risque d'extinction (Holman & Kokko, 2013). Par ailleurs, les femelles accouplées avec plusieurs mâles produiraient des descendants moins apparentés entre eux (portées constituées de demi-frères et demi-sœurs, plutôt que de frères et sœurs dans le cas de femelles accouplées avec un seul mâle). Ainsi, une population fondée par un petit nombre de femelles serait moins sujette à la consanguinité si les femelles se reproduisent avec plusieurs mâles, hypothèse supportée par des travaux chez la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Power & Holman, 2014).

D.Conclusions

I. Le système de reproduction chez *A. vulgare*, un « cercle vertueux » pour la diversité génétique

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence chez *A. vulgare* un système de reproduction étroitement lié à la diversité génétique individuelle, qui pourrait être qualifié d' « auto-entretien » de la diversité génétique : la richesse allélique est maintenue dans les portées et en conséquence dans les populations par le système de reproduction promiscuitaire, et les processus de sélection sexuelle agissant au niveau des individus ont pour conséquence une optimisation de

l'hétérozygotie des descendants. Or, les individus les plus hétérozygotes sont plus performants, ce qui pourrait contribuer à la viabilité des populations mais aussi au maintien de l'hétérozygotie au fil des générations puisque les hétérozygotes ont un meilleur succès reproducteur et que cette hétérozygotie est héritable. Cet isopode terrestre semble donc disposer de mécanismes susceptibles de réduire les risques d'extinction et de lui conférer un bon potentiel adaptatif. De telles informations concernant le maintien de la diversité génétique via le système de reproduction dans les populations en général sont précieuses, en particulier dans le contexte de la gestion des populations. Si sous nos latitudes, les isopodes terrestres sont plutôt considérés comme « bénéfiques » au vu de leur importante contribution à la formation et à la qualité des sols à travers leur activité détritivore (Zimmer, 2002), ils peuvent avoir un impact économique négatif dans d'autres régions du globe. C'est notamment le cas en Amérique du Sud, où *A. vulgare* est désormais considéré comme un ravageur au vu des dégâts qu'il cause dans les cultures de soja (Faberi *et al.*, 2011). Ainsi, les mesures de contrôle de ces populations (ou au moins leur évaluation) devraient prendre en compte l'impact du système de reproduction sur leur diversité et leur maintien. S'il est difficile d'agir directement sur le système de reproduction en populations naturelles, évaluer la « santé génétique » d'une population peut en effet nous renseigner sur son potentiel adaptatif et donc sur les stratégies à adopter.

II. Et chez les populations naturelles ?

Une grande partie de nos résultats a été obtenue à partir d'une lignée de laboratoire entretenue depuis 35 ans, pour laquelle des phénomènes de goulot d'étranglement suivi par la dérive génétique ont pu conduire à une composition génétique aberrante comparée aux populations naturelles. De plus, nous savons que le fond génétique des lignées peut avoir une influence importante sur les traits d'histoire de vies que nous avons mesurés. En particulier, la taille moyenne des portées varie significativement entre différentes lignées d'*A. vulgare* maintenues laboratoire (observation personnelle), et cela peut profondément impacter les pressions de sélection ayant conduit aux stratégies de reproductions que nous avons observées. Il convient donc de confirmer nos résultats avec des études réalisées directement sur le terrain, ou au moins sur des animaux récoltés en populations

naturelles. En particulier, la sélection intra- et intersexuelle basée sur les caractéristiques génétiques ne peut évoluer que si une variation sur ces critères est présente en population naturelle. Des processus affectant la répartition spatiale, tels que la dispersion ou le niveau de grégarité, et absents dans nos expérimentations en laboratoire, pourraient ainsi modifier le panel de partenaires sexuels auquel un individu donné est confronté. L'évaluation de la similarité génétique entre individus à une échelle locale est ainsi nécessaire pour déterminer si le choix pour la dissimilarité présente une valeur adaptative dans notre modèle. Un échantillonnage de groupes d'individus *A. vulgare* espacés de quelques centaines mètres a d'ores et déjà été réalisé dans une population naturelle de La Crèche (Deux-Sèvres) en prenant soin de relever les coordonnées GPS. L'analyse des caractéristiques génétiques des individus échantillonnés et la comparaison de diversité génétique intra- et inter-groupe devraient nous permettre d'estimer les capacités de dispersion ainsi que les éventuels comportements phylopatriques chez cette espèce grégaire. Nous pourrons ainsi estimer le risque de consanguinité en populations naturelles et en conséquence au niveau d'évitement associé.

III. *Wolbachia*, parasite de la reproduction... et de la sélection sexuelle pour la diversité génétique ?

Un facteur largement présent en populations naturelles est la bactérie endosymbiotique *Wolbachia*, dont nous avons très superficiellement abordé l'effet dans cette thèse. Pourtant, elle pourrait constituer une pression de sélection importante et intervenir dans divers processus étudiés dans nos travaux. Par exemple, les femelles symbiotiques sont connues pour avoir un comportement sexuel inadéquat conduisant à la fin prématurée de la séquence de copulation (Moreau *et al.*, 2001). Il est alors envisageable que ces femelles ne prennent pas les mêmes décisions que les femelles asymbiotiques, notamment en ce qui concerne les caractéristiques génétiques des partenaires sexuels. Il convient également de vérifier si on observe toujours un meilleur succès des mâles hétérozygotes lorsque les femelles disponibles sont infectées, l'infection pouvant altérer les capacités de choix des femelles (Beltran-Bech & Richard, 2014). Les mâles plus hétérozygotes pourraient également

monopoliser les femelles de meilleure qualité, ce qui pourrait se traduire par un accès privilégié aux femelles asymbiotiques lorsque les deux types de femelles sont disponibles.

IV. Quel apport des nouvelles technologies de séquençage à l'étude des HFC chez notre modèle ?

Des marqueurs de type SNP sont actuellement en cours de développement sur notre modèle. Leur utilisation dans des approches de génétique des populations est en cours de démocratisation suite à la baisse des coûts liés à leur séquençage, et des publications ayant pour objectif la détection de HFC sur de tels marqueurs commencent à voir le jour (Forstmeier *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2014b). Cependant, la pertinence de l'utilisation de SNP plutôt que de microsatellites est débattue, et différents auteurs ont comparé les performances de ces deux types de marqueurs utilisés à l'échelle populationnelle. Ainsi, Liu *et al.* (2005) ont montré chez l'humain que de façon générale, les marqueurs SNP sont moins informatifs que les marqueurs microsatellites, en tout cas pour déterminer la structure d'une population. Ces mêmes auteurs suggèrent cependant que les marqueurs SNP pourraient être plus performants s'ils sont disponibles en grand nombre, sans toutefois donner d'ordre de grandeur. Une étude plus récente sur le diamant mandarin *Taeniopygia guttata* a montré qu'un ensemble de seulement 11 marqueurs microsatellites était aussi performant que 1 359 marqueurs SNP pour détecter des HFC avec différents traits de valeur sélective, ces deux types de marqueurs étant eux-mêmes plus performants que le coefficient de consanguinité calculé à partir de pedigree (Forstmeier *et al.*, 2012). En revanche, (Hoffman *et al.*, 2014b) ont mis en évidence chez le phoque commun *Phoca vitulina* une HFC pour l'infection parasitaire bien plus forte avec 14 585 marqueurs SNP qu'avec 27 marqueurs microsatellites. Une autre étude réalisée sur un jeu de données sur la souris des sables *Peromyscus polionotus* suggère que les marqueurs SNP permettraient de mieux estimer la consanguinité à l'échelle du génome et seraient plus adaptés pour l'étude des HFC (Stoffel *et al.*, 2016). Ainsi, l'intégration de marqueurs SNP dans nos travaux nous permettra de compléter les connaissances centrées sur les isopodes terrestres, mais également d'apporter de nouveaux arguments

au débat microsatellites *vs* SNP, dans un contexte où ces derniers sont de plus en plus abordables et dont l'usage va vraisemblablement prendre de l'ampleur dans les prochaines années.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acevedo-Whitehouse, K., Spraker, T.R., Lyons, E., Melin, S.R., Gulland, F., Delong, R.L., *et al.* 2006. Contrasting effects of heterozygosity on survival and hookworm resistance in California sea lion pups. *Mol. Ecol.* **15**: 1973–1982.

Aguilera-Reyes, U., Zavala-Paramo, G., Valdez-Alarcon, J.J., Cano-Camacho, H., Garcia-Lopez, G.I. & Pescador-Salas, N. 2006. Multiple mating and paternity determinations in domestic swine (*Sus scrofa*). *Anim. Res.* **55**: 409–417.

Andersson, M. 1995. Evolution of reversed sex roles, sexual size dimorphism, and mating system in coucals (Centropodidae, Aves). *Biol. J. Linn. Soc.* **54**: 173–181.

Andersson, M. & Iwasa, Y. 1996. Sexual selection. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 53–58.

Andras, J.P. 2017. Genetic variation of the Caribbean sea fan coral, *Gorgonia ventalina*, correlates with survival of a fungal epizootic. *Mar. Biol.* **164**: 130.

Annavi, G., Newman, C., Buesching, C.D., Macdonald, D.W., Burke, T. & Dugdale, H.L. 2014. Heterozygosity-fitness correlations in a wild mammal population: accounting for parental and environmental effects. *Ecol. Evol.* **4**: 2594–2609.

Appel, C., Quadros, A.F. & Araujo, P.B. 2011. Marsupial extension in terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Nauplius* **19**: 123–128.

Ayres, J.S. & Schneider, D.S. 2008. Two ways to survive an infection: what resistance and tolerance can teach us about treatments for infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 889–895.

Badawi, M., Grève, P. & Cordaux, R. 2015. Feminization of the Isopod *Cylisticus convexus* after transinfection of the *w*VulC *Wolbachia* strain of *Armadillidium vulgare*. *PLOS ONE* **10**: e0128660.

Baer, B. & Schmid-Hempel, P. 1999. Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature* **397**: 151–154.

Balloux, F., Amos, W. & Coulson, T. 2004. Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Mol. Ecol.* **13**: 3021–3031.

Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., *et al.* 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* **471**: 51–57.

Bateman, A.J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**: 349–368.

Beauché, F. & Richard, F.J. 2013. The best timing of mate mearch in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea). *Plos One* **8**: e57737.

Bech, N., Depeux, C., Durand, S., Debenest, C., Lafitte, A. & Beltran-Bech, S. 2017. When GIS zooms in: spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare*. *Genetica* 1–10.

Beltran, S., Cezilly, F. & Boissier, J. 2008. Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in Schistosomes. *Plos One* **3**: e3328.

Beltran-Bech, S. & Richard, F.J. 2014. Impact of infection on mate choice. *Anim. Behav.* **90**: 159–170.

Bierne, N., Launey, S., Naciri-Graven, Y. & Bonhomme, F. 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* **148**: 1893–1906.

Bierne, N., Tsitrone, A. & David, P. 2000. An inbreeding model of associative overdominance during a population bottleneck. *Genetics* **155**: 1981–1990.

Bilde, T., Maklakov, A.A. & Schilling, N. 2007. Inbreeding avoidance in spiders: evidence for rescue effect in fecundity of female spiders with outbreeding opportunity. *J. Evol. Biol.* **20**: 1237–1242.

Birkhead, T.R. 1998. Cryptic Female Choice: Criteria for establishing female sperm choice. *Evolution* **52**: 1212–1218.

Birkhead, T.R. & Pizzari, T. 2002. Postcopulatory sexual selection. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 262–273.

Boonstra, R., Xia, X.H. & Pavone, L. 1993. Mating system of the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus*. *Behav. Ecol.* **4**: 83–89.

Bouchon, D., Cordaux, R. & Greve, P. 2008. Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: *Insect symbiosis* (K. Bourtzis & Miller, eds), pp. 273–294.

Bouchon, D., Rigaud, T. & Juchault, P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **265**: 1081–1090.

Braig, H.R., Zhou, W.G., 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*. *J. Bacteriol.* **180**: 2373–2378.

Brambilla, A., Biebach, I., Bassano, B., Bogliani, G. & von Hardenberg, A. 2015. Direct and indirect causal effects of heterozygosity on fitness-related traits in Alpine ibex. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **282**: 20141873.

Braquart-Varnier, C., Altinli, M., Pigeault, R., Chevalier, F., Greve, P., Bouchon, D., *et al.* 2015. The mutualistic side of *Wolbachia*-Isopod interactions: *Wolbachia* mediated protection against pathogenic intracellular bacteria. *Front. Microbiol.* **6**.

Braquart-Varnier, C., Lachat, M., Herbiniere, J., Johnson, M., Caubet, Y., Bouchon, D., *et al.* 2008. *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *Plos One* **3**.

Bretman, A., Wedell, N. & Tregenza, T. 2004. Molecular evidence of post-copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **271**: 159–164.

Brockton, V., Hammond, J.A. & Smith, V.J. 2007. Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mol. Immunol.* **44**: 943–949.

Brody, M.S., Edgar, M.H. & Lawlor, L.R. 1983. A cost of reproduction in a terrestrial isopod. *Evolution* **37**: 653–655.

Brown, J.L. 1997. A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behav. Ecol.* **8**: 60–65.

Burt, A. 2000. Perspective: sex, recombination, and the efficacy of selection--was Weismann right? *Evol. Int. J. Org. Evol.* **54**: 337–351.

Calleri, D.V., Reid, E.M., Rosengaus, R.B., Vargo, E.L. & Traniello, J.F.A. 2006. Inbreeding and disease resistance in a social insect: effects of heterozygosity on immunocompetence in the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **273**: 2633–2640.

Carballo, M., Baldenegro, F., Bollatti, F., Peretti, A.V. & Aisenberg, A. 2017. No pain, no gain: Male plasticity in burrow digging according to female rejection in a sand-dwelling wolf spider. *Behav. Processes* **140**: 174–180.

Carissan-Lloyd, F.M.M., Pipe, R.K. & Beaumont, A.R. 2004. Immunocompetence and heterozygosity in the mussel *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **84**: 377–382.

Cerenius, L. & Soderhall, K. 2013. Variable immune molecules in invertebrates. *J. Exp. Biol.* **216**: 4313–4319.

Chapman, J.R., Nakagawa, S., Coltman, D.W., Slate, J. & Sheldon, B.C. 2009. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Mol. Ecol.* **18**: 2746–2765.

Charlesworth, B., Morgan, M. & Charlesworth, D. 1993. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics* **134**: 1289–1303.

Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 237–268.

Charlesworth, D. & Willis, J.H. 2009. Fundamental concepts in genetics: the genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 783–796.

Chevalier, F. 2011. La symbiose à *Wolbachia* (alpha-protéobactérie) : impacts sur le système immunitaire et l'immunocompétence de son hôte *Armadillidium vulgare* (crustacé isopode). Université de Poitiers.

Chevalier, F., Herbiniere-Gaboreau, J., Bertaux, J., Raimond, M., Morel, F., Bouchon, D., *et al.* 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: meeting with their invaders, *Wolbachia*. *Plos One* **6**.

Chevalier, F., Herbiniere-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., *et al.* 2012. Feminizing *Wolbachia*: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *Bmc Microbiol.* **12**: S1.

Cluttonbrock, T. & Vincent, A. 1991. Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature* **351**: 58–60.

Cohas, A. 2005. Causes évolutives des paternités hors-couple chez les espèces socialement monogames : l'exemple de la marmotte alpine (*Marmota marmota*). Université Claude Bernard - Lyon I, Lyon.

Cohas, A., Yoccoz, N.G. & Allaine, D. 2007. Extra-pair paternity in alpine marmots, *Marmota marmota*: genetic quality and genetic diversity effects. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **61**: 1081–1092.

Cohas, A., Yoccoz, N.G., Bonenfant, C., Goossens, B., Genton, C., Galan, M., *et al.* 2008. The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots. *Anim. Behav.* **76**: 87–95.

Coltman, D.W. & Slate, J. 2003. Microsatellite measures of inbreeding: a meta-analysis. *Evolution* **57**: 971–983.

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.

Cordaux, R., Pichon, S., Hatira, H.B.A., Doublet, V., Greve, P., Marcade, I., *et al.* 2012. Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. *Zookeys* 123–131.

Cotelli, F., Ferraguti, M., Lanzavecchia, G. & Loralamiadonin, C. 1976. Spermatozoon of Peracarida .1. Spermatozoon of Terrestrial Isopods. *J. Ultrastruct. Res.* **55**: 378–390.

Coulon, A. 2010. genhet: an easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 167–169.

Coulson, T. & Clegg, S. 2014. Population biology: Fur seals signal their own decline. *Nature* **511**: 414–415.

Coutant, M.-F. 1977. Contribution à l'étude cytologique et fonctionnelle des hémocytes et des organes hématopoïétiques chez l'oniscoïde *Porcellio dilatatus*, Brandt. Université de Poitiers.

Crow, J.F. 2008. Mid-century controversies in population genetics.

Curtsinger, J.W. 1991. Sperm competition and the evolution of multiple mating. *Am. Nat.* **138**: 93–102.

Da Silva, A., Luikart, G., Yoccoz, N.G., Cohas, A. & Allaine, D. 2006. Genetic diversity-fitness correlation revealed by microsatellite analyses in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Conserv. Genet.* **7**: 371–382.

Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. J Murray, London.

Darwin, C. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex.* J. Murray, London.

David, P. 1998. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* **80**: 531–537.

David, P., Delay, B. & Jarne, P. 1997. Heterozygosity and growth in the marine bivalve *Spisula ovalis*: testing alternative hypotheses. *Genet. Res.* **70**: 215–223.

David, P., Pujol, B., Viard, F., Castella, V. & Goudet, J. 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Mol. Ecol.* **16**: 2474–2487.

Diehl, W. & Biesiot, P. 1994. Relationships between multilocus heterozygosity and morphometric indexes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **182**: 237–250.

Diesel, R. 1990. Sperm competition and reproductive success in the decapod *Inachus phalangium* (Majidae) - a male ghost spider crab that seals off rivals sperm. *J. Zool.* **220**: 213–223.

Dong, Y. & Dimopoulos, G. 2009. Anopheles Fibrinogen-Related Proteins provide expanded pattern recognition capacity against bacteria and malaria parasites. *J. Biol. Chem.* **284**: 9835–9844.

Dunn, P.O., Bollmer, J.L., Freeman-Gallant, C.R. & Whittingham, L.A. 2013. MHC variation is related to a sexually selected ornament, survival, and parasite resistance in common Yellowthroats. *Evolution* **67**: 679–687.

Durand, S., Beauché, F., Richard, F.-J. & Beltran-Bech, S. 2015. How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*? *Ethology* **121**: 1122–1130.

Durand, S., Cohas, A., Braquart-Varnier, C. & Beltran-Bech, S. 2017. Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **71**: 90.

Eberhard, W.G. 2000. Criteria for demonstrating postcopulatory female choice. *Evolution* **54**: 1047–1050.

Eberhard, W.G. 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton.

Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., *et al.* 2011. A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos One* **6**: e19379.

Emlen, S. & Oring, L. 1977. Ecology, sexual selection, and evolution of mating systems. *Science* **197**: 215–223.

Faberi, A.J., Lopez, A.N., Clemente, N.L. & Manetti, P.L. 2011. Importance of diet in the growth, survivorship and reproduction of the no-tillage pest *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda). *Rev. Chil. Hist. Nat.* **84**: 407–417.

Firman, R.C., Gasparini, C., Manier, M.K. & Pizzari, T. 2017. Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends Ecol. Evol.* **32**: 368–382.

Firman, R.C. & Simmons, L.W. 2015. Gametic interactions promote inbreeding avoidance in house mice. *Ecol. Lett.* **18**: 937–943.

Fischer, M. & Matthies, D. 1998. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *Am. J. Bot.* **85**: 811–819.

Fisher, R.A. 1915. The evolution of sexual preference. *Eugen. Rev.* **7**: 184.

Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford.

Fitzpatrick, J.L. & Evans, J.P. 2014. Postcopulatory inbreeding avoidance in guppies. *J. Evol. Biol.* **27**: 2585–2594.

Foerster, K., Delhey, K., Johnsen, A., Lifjeld, J.T. & Kempenaers, B. 2003. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* **425**: 714–717.

Forsman, A. 2014. Effects of genotypic and phenotypic variation on establishment are important for conservation, invasion, and infection biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 302–307.

Forstmeier, W., Schielzeth, H., Mueller, J.C., Ellegren, H. & Kempenaers, B. 2012. Heterozygosity-fitness correlations in zebra finches: microsatellite markers can be better than their reputation. *Mol. Ecol.* **21**: 3237–3249.

Fortin, M. 2016. Influence de la bactérie féminisante *Wolbachia* sur le comportement de choix du partenaire et la fitness de son hôte *Armadillidium vulgare*. Université de Poitiers, Poitiers.

Fossøy, F., Johnsen, A. & Lifjeld, J.T. 2009. Cell-mediated immunity and multi-locus heterozygosity in bluethroat nestlings. *J. Evol. Biol.* **22**: 1954–1960.

Fox, C.W. & Reed, D.H. 2011. Inbreeding depression increases with environmental stress: an experimental study and meta-analysis. *Evolution* **65**: 246–258.

Fox, C.W. & Reed, D.H. 2010. Inbreeding depression increases with maternal age in a seed-feeding beetle. *Evol. Ecol. Res.* **12**: 961–972.

Frankham, R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet. Res.* **66**: 95–107.

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **126**: 131–140.

Freeman-Gallant, C.R., Meguerdichian, M., Wheelwright, N.T. & Sollecito, S.V. 2003. Social pairing and female mating fidelity predicted by restriction fragment length polymorphism similarity at the major histocompatibility complex in a songbird. *Mol. Ecol.* **12**: 3077–3083.

Frere, C.H., Chandrasoma, D. & Whiting, M.J. 2015. Polyandry in dragon lizards: inbred paternal genotypes sire fewer offspring. *Ecol. Evol.* **5**: 1686–1692.

Fromhage, L., Kokko, H. & Reid, J.M. 2009. Evolution of mate choice for genome-wide heterozygosity. *Evolution* **63**: 684–694.

Futuyma, D.J. 2013. *Evolution, Third Edition*, Sinauer. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

Gage, M. 1992. Removal of rival sperm during copulation in a bettle, *Tenebrio molitor*. *Anim. Behav.* **44**: 587–589.

Gage, M.J.G., Surridge, A.K., Tomkins, J.L., Green, E., Wiskin, L., Bell, D.J., *et al.* 2006. Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Curr. Biol.* **16**: 612–617.

Garcia-Gonzalez, F. & Simmons, L.W. 2011. Good genes and sexual selection in dung beetles (*Onthophagus taurus*): genetic variance in egg-to-adult and adult viability. *Plos One* **6**: e16233.

Garcia-Navas, V., Ortego, J. & Sanz, J.J. 2009. Heterozygosity-based assortative mating in blue tits (*Cyanistes caeruleus*): implications for the evolution of mate choice. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **276**: 2931–2940.

Geßner, C., Johnson, S.L., Fisher, P., Clarke, S., Rutherford, K., Symonds, J., *et al.* 2017. Male-female relatedness at specific SNP-linkage groups influences cryptic female choice in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Proc. Biol. Sci.* **284**.

Ghosh, J., Lun, C.M., Majeske, A.J., Sacchi, S., Schrankel, C.S. & Smith, L.C. 2011. Invertebrate immune diversity. *Dev. Comp. Immunol.* **35**: 959–974.

Giraud, I., Valette, V., Bech, N., Grandjean, F. & Cordaux, R. 2013. Isolation and characterization of microsatellite loci for the Isopod Crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in Terrestrial Isopods. *Plos One* **8**: e76639.

Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., *et al.* 1999. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 10086–10091.

Gwynne, D.T. 2008. Sexual conflict over nuptial gifts in insects. In: *Annual Review of Entomology*, pp. 83–101. Annual Reviews, Palo Alto.

Hamilton, W. & Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds - a role for parasites. *Science* **218**: 384–387.

Hansson, B. & Westerberg, L. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol. Ecol.* **11**: 2467–2474.

Harrison, X.A., York, J.E., Cram, D.L. & Young, A.J. 2013. Extra-group mating increases inbreeding risk in a cooperatively breeding bird. *Mol. Ecol.* **22**: 5700–5715.

Hawley, D.M., Sydenstricker, K.V., Kollias, G.V. & Dhondt, A.A. 2005. Genetic diversity predicts pathogen resistance and cell-mediated immunocompetence in house finches. *Biol. Lett.* **1**: 326–329.

Hayward, A. & Gillooly, J.F. 2011. The cost of sex: quantifying energetic investment in gamete production by males and females. *PLoS ONE* **6**.

Heath, D.D., Bryden, C.A., Shrimpton, J.M., Iwama, G.K., Kelly, J. & Heath, J.W. 2002. Relationships between heterozygosity, allelic distance (d^2), and reproductive traits in chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**: 77–84.

Hedrick, P.W. 2002. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution* **56**: 1902–1908.

Hemmings, N.L., Slate, J. & Birkhead, T.R. 2012. Inbreeding causes early death in a passerine bird. *Nat. Commun.* **3**: 863.

Hoffman, J.I., Forcada, J., Trathan, P.N. & Amos, W. 2007. Female fur seals show active choice for males that are heterozygous and unrelated. *Nature* **445**: 912–914.

Hoffman, J.I., Simpson, F., David, P., Rijks, J.M., Kuiken, T., Thorne, M.A.S., *et al.* 2014a. High-throughput sequencing reveals inbreeding depression in a natural population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 3775–3780.

Hoffman, J.I., Simpson, F., David, P., Rijks, J.M., Kuiken, T., Thorne, M.A.S., *et al.* 2014b. High-throughput sequencing reveals inbreeding depression in a natural population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 3775–3780.

Hoglund, J., Piertney, S.B., Alatalo, R.V., Lindell, J., Lundberg, A. & Rintamaki, P.T. 2002. Inbreeding depression and male fitness in black grouse. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **269**: 711–715.

Hoglund, J., Wang, B., Saether, S.A., Blom, M.P.K., Fiske, P., Halvarsson, P., *et al.* 2017. Blood transcriptomes and de novo identification of candidate loci for mating success in lekking great snipe (*Gallinago media*). *Mol. Ecol.* **26**: 3458–3471.

Holman, L. & Kokko, H. 2013. The consequences of polyandry for population viability, extinction risk and conservation. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* **368**: 20120053.

Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* **50**: 346–363.

Houle, D., Morikawa, B. & Lynch, M. 1996. Comparing mutational variabilities. *Genetics* **143**: 1467–1483.

Howard, H.W. 1943. Length of life of sperms in the woodlouse *Armadillidium vulgare* Latr. *Nature* **152**: 331–331.

Huo, Z., Li, N., Zhang, X., Li, Y., Yan, X. & Yang, F. 2017. Inbreeding depression on growth and survival of full-sib family of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *J. Ocean Univ. China* **16**: 145–150.

Huxley, J. 1942. *Evolution: the modern synthesis*. Allen & Unwin, London.

Ilmonen, P., Stundner, G., Thoss, M. & Penn, D.J. 2009. Females prefer the scent of outbred males: good-genes-as-heterozygosity? *Bmc Evol. Biol.* **9**.

Jacobsen, C.S. & Bech, T.B. 2012. Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Res. Int.* **45**: 557–566.

Janicke, T., Haederer, I.K., Lajeunesse, M.J. & Anthes, N. 2016. Darwinian sex roles confirmed across the animal kingdom. *Sci. Adv.* **2**: e1500983.

Jennions, M.D. & Fromhage, L. 2017. Not all sex ratios are equal: the Fisher condition, parental care and sexual selection. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* **372**: 20160312.

Jennions, M.D. & Petrie, M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biol. Rev.* **75**: 21–64.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. & Soderhall, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* **211**: 213–236.

Jirotkul, M. 1999. Operational sex ratio influences female preference and male–male competition in guppies. *Anim. Behav.* **58**: 287–294.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. & Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* **191**: 45–52.

Johnson, L.K. & Hubbell, S.P. 1984. Male choice. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **15**: 183–188.

Juchault, P., Rigaud, T. & Mocquard, J. 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-Int. J. Ecol.* **14**: 547–562.

Kaunisto, K.M., Viitaniemi, H.M., Leder, E.H. & Suhonen, J. 2013. Association between host's genetic diversity and parasite burden in damselflies. *J. Evol. Biol.* **26**: 1784–1789.

Keeling, P.J. 2009. Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**: 613–619.

Keller, L.F. & Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* **17**: 230–241.

Kempenaers, B. 2007. Mate choice and genetic quality: A review of the heterozygosity theory. In: *Advances in the Study of Behavior, Vol 37* (H. J. Brockmann, T. J. Roper, M. Naguib, K. E. WynneEdwards, C. Barnard, & J. Mitani, eds), pp. 189–278. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.

Kight, S.L. & Ozga, M. 2001. Costs of reproduction in the Terrestrial Isopod *Porcellio laevis* Latreille (Isopoda : Oniscidea): Brood-bearing and locomotion. *J. Kans. Entomol. Soc.* **74**: 166–171.

Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at molecular level. *Nature* **217**: 624-.

Knief, U., Forstmeier, W., Pei, Y., Ihle, M., Wang, D., Martin, K., *et al.* 2017. A sex-chromosome inversion causes strong overdominance for sperm traits that affect siring success. *Nat. Ecol. Evol.* **1**: 1177.

Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M.D. & Morley, J. 2003. The evolution of mate choice and mating biases. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **270**: 653–664.

Kokko, H. & Jennions, M.D. 2008. Parental investment, sexual selection and sex ratios. *J. Evol. Biol.* **21**: 919–948.

Kvarnemo, C. & Ahnesjo, I. 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 404–408.

Kvarnemo, C. & Simmons, L.W. 1999. Variance in female quality, operational sex ratio and male mate choice in a bushcricket. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **45**: 245–252.

Lachat, M. 2009. Impact de deux souches de *Wolbachia* sur les traits d'histoire de vie de leurs hôtes *Armadillidium vulgare*. Université de Poitiers, Poitiers.

Laloi, D., Eizaguirre, C., Federici, P. & Massot, M. 2011. Female choice for heterozygous mates changes along successive matings in a lizard. *Behav. Processes* **88**: 149–154.

Leclercq, Sb., Theze, J., Chebbi, M.A., Giraud, I., Moumen, B., Ernenwein, L., *et al.* 2016. Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 15036–15041.

Lee, P.L.M. & Hays, G.C. 2004. Polyandry in a marine turtle: Females make the best of a bad job. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 6530–6535.

Lefebvre, F. 2002. Stratégies de reproduction chez les crustacés isopodes terrestres. Université de Poitiers, Poitiers.

Lefebvre, F. & Caubet, Y. 1999. On the male-effect in the terrestrial Crustacean *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). *Invertebr. Reprod. Dev.* **35**: 55–64.

Lehmann, L., Keller, L.F. & Kokko, H. 2007. Mate choice evolution, dominance effects, and the maintenance of genetic variation. *J. Theor. Biol.* **244**: 282–295.

Lehtonen, J., Parker, G.A. & Scharer, L. 2016. Why anisogamy drives ancestral sex roles. *Evolution* **70**: 1129–1135.

Lemaitre, J.-F., Ramm, S.A., Hurst, J.L. & Stockley, P. 2012. Inbreeding avoidance behaviour of male bank voles in relation to social status. *Anim. Behav.* **83**: 453–457.

Lewis, Z. & Wedell, N. 2009. Male moths reduce sperm investment in relatives. *Anim. Behav.* **77**: 1547–1550.

Lihoreau, M., Zimmer, C. & Rivault, C. 2008. Mutual mate choice: when it pays both sexes to avoid inbreeding. *Plos One* **3**: e3365.

Lipshutz, S.E. 2017. Divergent competitive phenotypes between females of two sex-role-reversed species. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **71**: UNSP 106.

Liu, N.J., Chen, L., Wang, S., Oh, C.G. & Zhao, H.Y. 2005. Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. *Bmc Genet.* **6**: S26.

Lovlie, H., Gillingham, M.A.F., Worley, K., Pizzari, T. & Richardson, D.S. 2013. Cryptic female choice favours sperm from major histocompatibility complex-dissimilar males. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **280**.

Luikart, G., Pilgrim, K., Visty, J., Ezenwa, V.O. & Schwartz, M.K. 2008. Candidate gene microsatellite variation is associated with parasitism in wild bighorn sheep. *Biol. Lett.* **4**: 228–231.

Lyons, K., Chabot, C.L., Mull, C.G., Holder, C.N.P. & Lowe, C.G. 2017. Who's My Daddy? Considerations for the influence of sexual selection on multiple paternity in elasmobranch mating systems. *Ecol. Evol.* **7**: 5603–5612.

MacDougall-Shackleton, E.A., Derryberry, E.P., Foufopoulos, J., Dobson, A.P. & Hahn, T.P. 2005. Parasite-mediated heterozygote advantage in an outbred songbird population. *Biol. Lett.* **1**: 105–107.

Markert, J.A., Grant, P.R., Grant, B.R., Keller, L.F., Coombs, J.L. & Petren, K. 2004. Neutral locus heterozygosity, inbreeding, and survival in Darwin's ground finches (*Geospiza fortis* and *G. scandens*). *Heredity* **92**: 306–315.

Markow, T.A. 1997. Assortative fertilization in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 7756–7760.

Marr, A.B., Arcese, P., Hochachka, W.M., Reid, J.M. & Keller, L.F. 2006. Interactive effects of environmental stress and inbreeding on reproductive traits in a wild bird population. *J. Anim. Ecol.* **75**: 1406–1415.

Marsh, J.N., Vega-Trejo, R., Jennions, M.D. & Head, M.L. 2017. Why does inbreeding reduce male paternity? Effects on sexually selected traits. *Evol. Int. J. Org. Evol.*, doi: 10.1111/evo.13339.

Mazzei, V., Longo, G. & Brundo, M.V. 2014. Spermiophagic activity in the female genital system of some species of terrestrial isopods (Crustacea, Halophilosciidae). *Tissue Cell* **46**: 255–259.

McCullough, E.L., Buzatto, B.A. & Simmons, L.W. 2017. Benefits of polyandry: Molecular evidence from field-caught dung beetles. *Mol. Ecol.* **26**: 3546–3555.

McNeely, J.A., Miller, K.R., Reid, W.V., Mittermeier, R.A. & Werner, T.B. 1990. Conserving the world's biological diversity. *Conserv. Worlds Biol. Divers.*

Mead, F.A. 1973. Recherches sur la reproduction et le comportement sexuel des Isopodes terrestres. Université de Provence.

Middha, S. & Wang, X. 2008. Evolution and potential function of fibrinogen-like domains across twelve *Drosophila* species. *BMC Genomics* **9**: 260.

Minias, P., Wojczulanis-Jakubas, K., Rutkowski, R. & Kaczmarek, K. 2015. Local heterozygosity effects on nestling growth and condition in the great cormorant. *Evol. Biol.* **42**: 452–460.

Mitchell, J., Vitikainen, E.I.K., Wells, D.A., Cant, M.A. & Nichols, H.J. 2017. Heterozygosity but not inbreeding coefficient predicts parasite burdens in the banded mongoose. *J. Zool.* **302**: 32–39.

Mitton, J.B., Schuster, W.S.F., Cothran, E.G. & Defries, J.C. 1993. Correlation between the individual heterozygosity of parents and their offspring. *Heredity* **71**: 59–63.

Mocquard, J.P., Juchault, P. & Souty-Grosset, C. 1989. The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). In: *Monografia. Monitore zoologico italiano*, pp. 455–475. [s.n.].

Møller, A.P. & Jennions, M.D. 2001. How important are direct fitness benefits of sexual selection? *Naturwissenschaften* **88**: 401–415.

Mongue, A.J., Ahmed, M.Z., Tsai, M.V. & de Roode, J.C. 2015. Testing for cryptic female choice in monarch butterflies. *Behav. Ecol.* **26**: 386–395.

Moreau, J. 2001. Impact des bactéries intracytoplasmiques féminisantes *Wolbachia* chez les isopodes terrestres : interactions entre sex-ratio anormaux et stratégies de reproduction. Université de Tours, Tours.

Moreau, J., Bertin, A., Caubet, Y. & 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. 2000. Operational sex ratio in terrestrial isopods: interaction between potential rate of reproduction and *Wolbachia*-induced sex ratio distortion. *Oikos* **91**: 477–484.

Moreau, J. & Rigaud, T. 2002. The shape of calcium carbonate deposits as an external marker for female reproductive status in terrestrial isopods. *J. Crustac. Biol.* **22**: 353–356.

Moreau, J., Seguin, S., Caubet, Y. & Rigaud, T. 2002. Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial Crustacean. *Anim. Behav.* **64**: 569–577.

Morin, E. 2017. *Détermination de la capacité de dispersion et de la structuration génétique d'un isopode terrestre (i.e.* Armadillidium nasatum*) au sein d'un paysage agropastoral*. Université de Poitiers, Poitiers.

Müller, T. & Müller, C. 2016. Consequences of mating with siblings and nonsiblings on the reproductive success in a leaf beetle. *Ecol. Evol.* **6**: 3185–3197.

Muraille, E. 2014. Generation of Individual diversity: a too neglected fundamental property of adaptive immune system. *Front. Immunol.* **5**.

Murray, R.L., Herridge, E.J., Ness, R.W. & Bussiere, L.F. 2017. Are sex ratio distorting endosymbionts responsible for mating system variation among dance flies (Diptera: *Empidinae*)? *Plos One* **12**: e0178364.

Neff, B.D. & Pitcher, T.E. 2002. Assessing the statistical power of genetic analyses to detect multiple mating in fishes. *J. Fish Biol.* **61**: 739–750.

Neff, B.D. & Pitcher, T.E. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol. Ecol.* **14**: 19–38.

Newcomer, S.D., Zeh, J.A. & Zeh, D.W. 1999. Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 10236–10241.

Ng, T.H., Chiang, Y.-A., Yeh, Y.-C. & Wang, H.-C. 2015. Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods (Reprinted from Dev Comp Immunol, vol 46, pg 129-138, 2014). *Dev. Comp. Immunol.* **48**: 306–314.

Nietlisbach, P. & Hadfield, J.D. 2015. Heritability of heterozygosity offers a new way of understanding why dominant gene action contributes to additive genetic variance. *Evolution* **69**: 1948–1952.

Noël, C. 2014. *Etude de transcriptomes d'isopodes terrestres (Oniscidea) : assemblage de novo, analyses comparatives et identification de gènes d'intérêts*. Stage de Master 2, Université de Poitiers.

Olsson, M., Madsen, T., Nordby, J., Wapstra, E., Ujvari, B. & Wittsell, H. 2003. Major histocompatibility complex and mate choice in sand lizards. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **270**: S254–S256.

Olsson, M., Shine, R., Madsen, T., Gullberg, A. & Tegelstrom, H. 1996. Sperm selection by females. *Nature* **383**: 585–585.

Paris, O.H. & Pitelka, F.A. 1962. Population characteristics of terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* in California grassland. *Ecology* **43**: 229-.

Parker, G. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **45**: 525-.

Parker, G.A. 2006. Sexual conflict over mating and fertilization: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* **361**: 235–259.

Pearce, E.J. & MacDonald, A.S. 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 499–511.

Peccoud, J., Loiseau, V., Cordaux, R. & Gilbert, C. 2017. Massive horizontal transfer of transposable elements in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 4721–4726.

Penn, D.J., Damjanovich, K. & Potts, W.K. 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 11260–11264.

Pilakouta, N., Sieber, D.J. & Smiseth, P.T. 2016. Sibling competition does not exacerbate inbreeding depression inthe burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. *J. Evol. Biol.* **29**: 704–710.

Pilakouta, N. & Smiseth, P. 2017. Female mating preferences for outbred versus inbred males are conditional upon the female's own inbreeding status. *Anim. Behav.* **123**: 369–374.

Pizzari, T. & Birkhead, T.R. 2000. Female feral fowl eject sperm of subdominant males. *Nature* **405**: 787–789.

Power, D.J. & Holman, L. 2014. Polyandrous females found fitter populations. *J. Evol. Biol.* **27**: 1948–1955.

Price, M.R. & Hadfield, M.G. 2014. Population genetics and the effects of a severe bottleneck in an ex situ population of critically endangered hawaiian tree snails. *Plos One* **9**: e114377.

Prugnolle, F., Choisy, M., Théron, A., Durand, P. & De Meeûs, T. 2004. Sex-specific correlation between heterozygosity and clone size in the trematode *Schistosoma mansoni*. *Mol. Ecol.* **13**: 2859–2864.

Pusey, A. & Wolf, M. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 201–206.

Quevarec, L. 2013. *Lien entre paramètres immunitaires et hétérozygotie chez* Armadillidium vulgare. Stage de master 1, Université de Poitiers.

Raberg, L., Sim, D. & Read, A.F. 2007. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science* **318**: 812–814.

Reed, D.H. & Frankham, R. 2003a. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* **17**: 230–237.

Reed, D.H. & Frankham, R. 2003b. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* **17**: 230–237.

Relf, J.M., Chisholm, J.R.S., Kemp, G.D. & Smith, V.J. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* **264**: 350–357.

Reynolds, J.D. 1996. Animal breeding systems. *Trends Ecol. Evol.* **11**: A68–A72.

Richard, M., Massot, M., Clobert, J. & Meylan, S. 2012. Litter quality and inflammatory response are dependent on mating strategy in a reptile. *Oecologia* **170**: 39–46.

Richardson, D.S., Komdeur, J. & Burke, T. 2004. Inbreeding in the seychelles warbler: Environment-dependent maternal effects. *Evolution* **58**: 2037–2048.

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

Rigaud, T. & Moreau, M. 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. B-Biol. Sci.* **271**: 1941–1946.

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

Rius, M. & Darling, J.A. 2014. How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends Ecol. Evol.* **29**: 233–242.

Roberts, M.L., Buchanan, K.L. & Evans, M.R. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Anim. Behav.* **68**: 227–239.

Robinson, M.R., Sander van Doorn, G., Gustafsson, L. & Qvarnström, A. 2012. Environment-dependent selection on mate choice in a natural population of birds. *Ecol. Lett.* **15**: 611–618.

Roff, D. & Mousseau, T. 1987. Quantitative genetics and fitness - Lessons from *Drosophila*. *Heredity* **58**: 103–118.

Rolff, J. 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.* **79**: 2176–2180.

Rossiter, S.J., Jones, G., Ransome, R.D. & Barratt, E.M. 2001. Outbreeding increases offspring survival in wild greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **268**: 1055–1061.

Rottschaefer, S.M. & Lazzaro, B.P. 2012. No effect of *Wolbachia* on resistance to intracellular infection by pathogenic bacteria in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* **7**: e40500.

Rovelli, V., Randi, E., Davoli, F., Macale, D., Bologna, M.A. & Vignoli, L. 2015. She gets many and she chooses the best: polygynandry in *Salamandrina perspicillata* (Amphibia: Salamandridae). *Biol. J. Linn. Soc.* **116**: 671–683.

Rowe, L. 1994. The costs of mating and mate choice in water striders. *Anim. Behav.* **48**: 1049–1056.

Ryder, T.B., Tori, W.P., Blake, J.G., Loiselle, B.A. & Parker, P.G. 2010. Mate choice for genetic quality: a test of the heterozygosity and compatibility hypotheses in a lek-breeding bird. *Behav. Ecol.* **21**: 203–210.

Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W. & Hanski, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* **392**: 491–494.

Sassaman, C. 1978. Mating systems in Porcellionid Isopods: multiple paternity and sperm mixing in *Porcellio scaber* Latr. *Heredity* **41**: 385–397.

Schmalfuss, H. 1984. Eco-morphological strategies in terrestrial isopods. In: *The biology of terrestrial isopods* (S. L. Sutton & D. M. Holdich, eds), pp. 49–63. Clarendon Press, Oxford.

Shaner, P.-J.L., Chen, Y.-R., Lin, J.-W., Kolbe, J.J. & Lin, S.-M. 2013. Sex-specific correlations of individual heterozygosity, parasite load, and scalation asymmetry in a sexually dichromatic lizard. *PLOS ONE* **8**: e56720.

Sicard, M., Chevalier, F., De Vlechouver, M., Bouchon, D., Greve, P. & Braquart-Varnier, C. 2010. Variations of immune parameters in terrestrial Isopods: a matter of gender, aging and *Wolbachia*. *Naturwissenschaften* **97**: 819–826.

Simmons, L.W. 2005. The evolution of polyandry: Sperm competition, sperm selection, and offspring viability. In: *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, pp. 125–146. Annual Reviews, Palo Alto.

Singh, S. & Zouros, E. 1978. Genetic variation associated with growth-rate in american oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution* **32**: 342–353.

Skaug, H., Fournier, D., Bolker, B., Magnusson, A. & Nielsen, A. 2016. Generalized Linear Mixed Models using "AD Model Builder" R package version 0.8.3.3.

Slate, J., Kruuk, L.E.B., Marshall, T.C., Pemberton, J.M. & Clutton-Brock, T.H. 2000. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **267**: 1657–1662.

Slate, J. & Pemberton, J.M. 2007. Admixture and patterns of linkage disequilibrium in a free-living vertebrate population. *J. Evol. Biol.* **20**: 1415–1427.

Söderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S. & Söderhäll, K. 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 661–672.

Soper, D.M., Delph, L.F. & Lively, C.M. 2012. Multiple paternity in the freshwater snail, *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecol. Evol.* **2**: 3179–3185.

Sorci, G., Moller, A.P. & Boulinier, T. 1997. Genetics of host-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* **12**: 196–200.

Sricharoen, S., Kim, J.J., Tunkijjanukij, S. & Soderhall, I. 2005. Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish. *Dev. Comp. Immunol.* **29**: 1017–1031.

Steel, C. 1980. Mechanisms of coordination between molting and reproduction in Terrestrial Isopod Crustacea. *Biol. Bull.* **159**: 206–218.

Steel, C. 1982. Stages of the intermoult cycle in the terrestrial isopod *Oniscus asellus* and their relation to biphasic cuticle secretion. *Can. J. Zool.* **60**: 429–437.

Stoffel, M.A., Esser, M., Kardos, M., Humble, E., Nichols, H., David, P., *et al.* 2016. inbreedR: an R package for the analysis of inbreeding based on genetic markers. *Methods Ecol. Evol.* **7**: 1331–1339.

Surbida, K.L. & Wright, J.C. 2001. Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda : Oniscidea). *Physiol. Biochem. Zool.* **74**: 894–906.

Sutton, S.L., Hassal, M., Willows, R., David, R.C., Grundy, A. & Sunderland, K.D. 1984. Life histories of terrestrial isopods: a study of intra- and interspecific variation. In: *The biology of terrestrial isopods* (S. L. Sutton & D. M. Holdich, eds), pp. 269–294. Clarendon Press, Oxford.

Suzuki, S. & Ziegler, A. 2005. Structural investigation of the female genitalia and sperm-storage sites in the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Arthropod Struct. Dev.* **34**: 441–454.

Szulkin, M., Bierne, N. & David, P. 2010. Heterozygosity-Fitness Correlations: A Time for Reappraisal. *Evolution* **64**: 1202–1217.

Takeda, N. 1984. The aggregation phenomenon in terrestrial isopods. In: *The biology of terrestrial isopods* (S. L. Sutton & D. M. Holdich, eds), pp. 381–404. Clarendon Press, Oxford.

Tarpy, D.R. & Seeley, T.D. 2006. Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens. *Naturwissenschaften* **93**: 195–199.

Theopold, U., Schmidt, O., Soderhall, K. & Dushay, M.S. 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* **25**: 289–294.

Therneau, T.M. 2015. coxme: mixed effects cox models. *R Package Version 22-4 Httpcranr-Proj.*

Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *Am. Nat.* **122**: 765–788.

Tiira, K., Laurila, A., Peuhkuri, N., Piironen, J., Ranta, E. & Primmer, C.R. 2003. Aggressiveness is associated with genetic diversity in landlocked salmon (*Salmo salar*). *Mol. Ecol.* **12**: 2399–2407.

Tregenza, T. & Wedell, N. 1998. Benefits of multiple mates in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Evolution* **52**: 1726–1730.

Tregenza, T. & Wedell, N. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review. *Mol. Ecol.* **9**: 1013–1027.

Tregenza, T. & Wedell, N. 2002. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. *Nature* **415**: 71–73.

Trivers, R.L. 1972. Parental investment and sexual selection. In: *Sexual selection and the descent of man* (B. Campbell, ed), pp. 136–179. Chicago, IL: Aldine.

Valette, V. 2015. Prévalences et impacts de *Wolbachia* sur la diversité génétique chez les isopodes terrestres, *Armadillidium vulgare* et *Porcellionides pruinosus*. Université de Poitiers, Poitiers.

Valette, V., Durand, S., Bech, N., Grandjean, F. & Beltran-Bech, S. 2017. Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*? *J. Evol. Biol.* **30**: 235–243.

Van Valen, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* **1**: 1–30.

Vandel, A. 1962. *Faune de France 66, Isopodes Terrestres*, Paul Lechevalier. Paris.

Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A. & Zenteno, E. 2009. Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun.* **15**: 179–188.

Vega-Trejo, R., Head, M.L. & Jennions, M.D. 2015. Evidence for inbreeding depression in a species with limited opportunity for maternal effects. *Ecol. Evol.* **5**: 1398–1404.

Verdon, J., Coutos-Thevenot, P., Rodier, M.-H., Landon, C., Depayras, S., Noel, C., *et al.* 2016. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the Terrestrial Crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front. Microbiol.* **7**: 1484.

Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. & Grandjean, F. 2012. Effects of parasitic sex-ratio distorters on host genetic structure in the *Armadillidium vulgare-Wolbachia* association. *J. Evol. Biol.* **25**: 264–276.

Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D. & Grandjean, F. 2007a. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* **397**: 58–66.

Verne, S., Moreau, J., Caubet, Y., Bouchon, D., Johnson, M. & Grandjean, F. 2007b. Male mating success during parturial intermoults in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* revealed by the use of a microsatellite locus. *J. Crustac. Biol.* **27**: 217–219.

Verne, S., Puillandre, N., Brunet, G., Gouin, N., Samollow, P.B., Anderson, J.D., *et al.* 2006. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 328–330.

Viney, M.E., Riley, E.M. & Buchanan, K.L. 2005. Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol. Evol.* **20**: 665–669.

Voegeli, B., Saladin, V., Wegmann, M. & Richner, H. 2013. Heterozygosity is linked to the costs of immunity in nestling great tits (*Parus major*). *Ecol. Evol.* **3**: 4815–4827.

Wagner, W.E. 1998. Measuring female mating preferences. *Anim. Behav.* **55**: 1029–1042.

Walker, D., Porter, B.A. & Avise, J.C. 2002. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Mol. Ecol.* **11**: 2115–2122.

Wang, J.L. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* **160**: 1203–1215.

Watson, P.J., Stallmann, R.R. & Arnqvist, G. 1998. Sexual conflict and the energetic costs of mating and mate choice in water striders. *Am. Nat.* **151**: 46–58.

Weeks, S.C., Reed, S.K., Ott, D.W. & Scanabissi, F. 2009. Inbreeding effects on sperm production in clam shrimp (*Eulimnadia texana*). *Evol. Ecol. Res.* **11**: 125–134.

Weetman, A.P. 1999. The immunology of pregnancy. *Thyroid* **9**: 643–646.

Wennersten, L. & Forsman, A. 2012. Population-level consequences of polymorphism, plasticity and randomized phenotype switching: a review of predictions. *Biol. Rev.* **87**: 756–767.

Werren, J.H., Baldo, L. & Clark, M.E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 741–751.

Werren, J.H., Zhang, W. & Guo, L.R. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. Biol. Sci.* **261**: 55–63.

Whitehorn, P.R., Tinsley, M.C., Brown, M.J.F., Darvill, B. & Goulson, D. 2011. Genetic diversity, parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **278**: 1195–1202.

Winternitz, J.C., Promerova, M., Polakova, R., Vinker, M., Schnitzer, J., Munclinger, P., *et al.* 2015. Effects of heterozygosity and MHC diversity on patterns of extra-pair paternity in the socially monogamous scarlet rosefinch. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **69**: 459–469.

Winternitz, J.C., Wares, J.P., Yabsley, M.J. & Altizer, S. 2014. Wild cyclic voles maintain high neutral and MHC diversity without strong evidence for parasite-mediated selection. *Evol. Ecol.* **28**: 957–975.

Worley, K., Collet, J., Spurgin, L.G., Cornwallis, C., Pizzari, T. & Richardson, D.S. 2010. MHC heterozygosity and survival in red junglefowl. *Mol. Ecol.* **19**: 3064–3075.

Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**: 0097-0159.

Wright, S. 1938. Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* **87**: 430–431.

Yasui, Y. 1997. A "'good-sperm'" model can explain the evolution of costly multiple mating by females. *Am. Nat.* **149**: 573–584.

Yasui, Y. 1998. The "genetic benefits" of female multiple mating reconsidered. *Trends Ecol. Evol.* **13**: 246–250.

Yue, G.H. & Chang, A. 2010. Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *Caridina ensifera*. *Plos One* **5**.

Zahavi, A. 1975. Mate Selection - Selection for a Handicap. *J. Theor. Biol.* **53**: 205–214.

Zandberg, L., Gort, G., van Oers, K. & Hinde, C.A. 2017. Direct fitness benefits explain mate preference, but not choice, for similarity in heterozygosity levels. *Ecol. Lett.*, doi: 10.1111/ele.12827.

Zane, L., Nelson, W.S., Jones, A.G. & Avise, J.C. 1999. Microsatellite assessment of multiple paternity in natural populations of a live bearing fish, *Gambusia holbrooki*. *J. Evol. Biol.* **12**: 61–69.

Zbinden, J.A., Largiader, A.R., Leippert, F., Margaritoulis, D. & Arlettaz, R. 2007. High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. *Mol. Ecol.* **16**: 3703–3711.

Zeh, J.A. & Zeh, D.W. 1996. The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **263**: 1711–1717.

Zeh, J.A. & Zeh, D.W. 1997. The evolution of polyandry II: Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **264**: 69–75.

Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B. & Loker, E.S. 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* **305**: 251–254.

Ziegler, A. & Suzuki, S. 2011. Sperm storage, sperm translocation and genitalia formation in females of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Peracarida, Isopoda). *Arthropod Struct. Dev.* **40**: 64–76.

Zimmer, M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda : Oniscidea): an evolutionary-ecological approach. *Biol. Rev.* **77**: 455–493.

ANNEXES

Annexe 1 : Présentation générale de l'isopode terrestre *Armadillidium vulgare*

Le cloporte commun *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) est un crustacé terrestre appartenant à l'ordre des isopodes. Il s'agit d'un crustacé cosmopolite, présent à l'origine dans le sud de l'Europe (Vandel, 1962) mais possédant désormais une répartition mondiale suite aux activités humaines. Cet animal lucifuge se trouve préférablement dans les milieux calcaires et ouverts, mais on le rencontre également dans une variété de milieux comme les zones boisées ou les milieux anthropisés comme les jardins. Son activité détritivore en fait un acteur important dans la dégradation de la matière organique. La capacité de dispersion chez cette espèce est actuellement inconnue, mais des analyses génétiques réalisées chez un isopode du même genre (*Armadillidium nasatum*) ont mis en évidence une distance de dispersion d'environ 140m au cours de la vie de l'individu (Morin, 2017).

Tous les isopodes terrestres possèdent un corps segmenté avec la même organisation en trois parties (**Figure A1.1**), à savoir le céphalon portant des organes sensoriels (œil et antennes) et les pièces buccales de type broyeur, le péréion constitué de sept segments portant chacun une paire d'appendices locomoteurs appelés péréiopodes, et enfin le pléon portant des pléopodes, dont certains sont spécialisés dans la reproduction chez les mâles, et d'autres (les pseudo-trachées) dans la respiration en milieu terrestre.

Les isopodes terrestres présentent plusieurs stratégies de défense contre les prédateurs (Schmalfuss, 1984). Ainsi, les *rollers* comme *A. vulgare* présentent un corps arrondi et se roulent en boule lorsqu'ils se sentent menacés, c'est le phénomène de volvation. Les *runners* sont étroits et allongés, et leur stratégie de défense est de fuir rapidement vers une cachette dès qu'ils sont dérangés. Leur cuticule lisse et épaisse est difficile à saisir. Enfin, les *clingers* sont larges et aplatis, et se plaquent contre le substrat d'où ils peuvent difficilement être détachés par un prédateur.

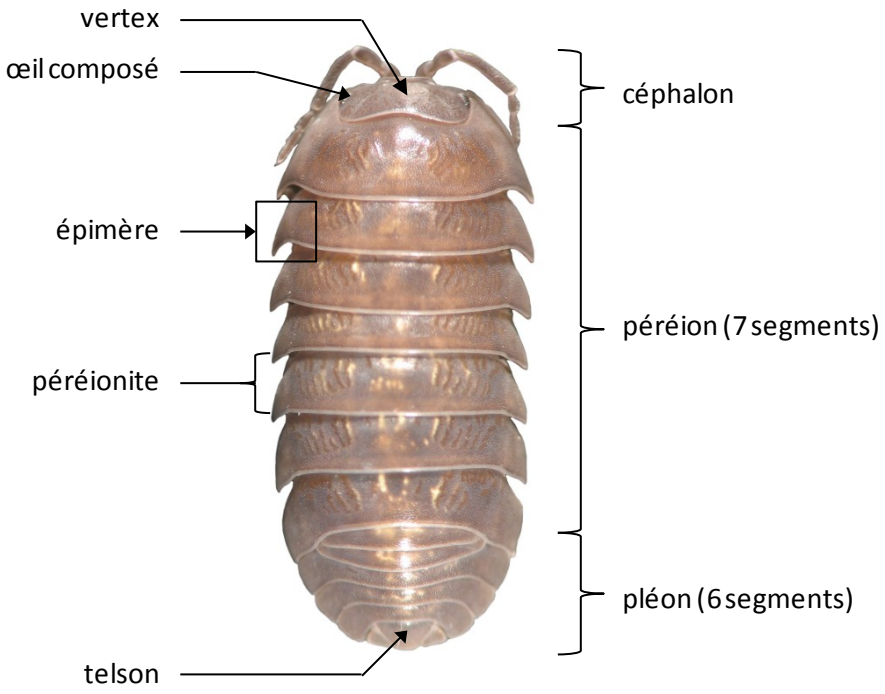

Figure A1.1 Morphologie générale d'*A. vulgare* en vue dorsale.

Cycle de mue

Le cloporte commun peut mesurer jusqu'à 18mm et grandit tout au long de sa vie (estimée à trois ans en laboratoire) au cours de ses mues successives. L'exuviation se produit en deux temps, c'est-à-dire d'abord la partie postérieure de l'animal (du 5ème péréionite au telson), puis la partie antérieure (du céphalon au 4ème péréionite) 12 à 24h plus tard. Le cycle de mue dure environ 28 jours hors période de reproduction lorsque les animaux sont élevés à une température de 20°C (Steel, 1980). Ce cycle se divise en quatre périodes en plus de l'exuviation, décrites par Steel (1982) chez les isopodes terrestres et énumérées ci-après :

- Période A/B : cette période durant 1 à 2 jours est la post-mue, ou post-ecdysis. L'animal vient d'effectuer l'exuviation et la partie antérieure de la cuticule est encore molle et dépigmentée.

L'animal ne peut donc pas se déplacer ou se nourrir, et est alors extrêmement sensible au risque de dessiccation et de prédation.

- Période C : d'une durée d'une quinzaine de jours, cette période est appelée intermue ou di-ecdysis, et est celle où l'animal est le plus actif en termes de locomotion et de prise alimentaire.
- Période D : la pré-mue, ou pro-ecdysis, s'étale sur 10 à 15 jours selon les individus. L'organisme prépare l'exuviation à travers la digestion de l'ancien exosquelette et l'élaboration du nouveau. Cette période, pendant laquelle l'animal est actif, se traduit par l'apparition de plaques blanches sur les sternites 1 à 4, correspondant à la mobilisation du carbonate de calcium issu de la digestion de l'ancien tégument. Ce calcium sera par la suite mobilisé dans la consolidation de la partie postérieure après la première étape de l'exuviation, permettant ainsi de limiter au maximum les pertes calciques.
- Période E : il s'agit de l'exuviation proprement dite, ou ecdysis, pendant laquelle l'animal ne peut se mouvoir.

Annexe 2 : Publication "When GIS zooms in: spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare*", *Genetica* 1–10 (publié en ligne en 2017)

Genetica
DOI 10.1007/s10709-017-9992-8

ORIGINAL PAPER

When GIS zooms in: spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare*

Nicolas Bech[1] · Charlotte Depeux[1] · Sylvine Durand[1] · Catherine Debenest[1] · Alexandra Lafitte[1] · Sophie Beltran-Bech[1]

Received: 8 February 2017 / Accepted: 18 September 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract Geographic information system (GIS) tools are designed to illustrate, analyse and integrate geographic or spatial data, usually on a macroscopic scale. By contrast, genetic tools focus on a microscopic scale. Because in reality, landscapes have no predefined scale, our original study aims to develop a new approach, combining both cartographic and genetic approaches to explore microscopic landscapes. For this, we focused on *Armadillidium vulgare*, a terrestrial isopod model in which evolutionary pressures imposed by terrestrial life have led to the development of internal fertilisation and, consequently, to associated physiological changes. Among these, the emergence of internal receptacles, found in many taxa ranging from mammals to arthropods, allowed females to store sperm from several partners, enabling multipaternity. Among arthropods, terrestrial isopods like the polygynandrous *A. vulgare* present a female structure, the *marsupium*, in which fertilised eggs migrate and develop into *mancae* (larval stage). To test our innovative combined approach, we proposed different males to four independent females, and at the end of incubation in the *marsupium*, we mapped (using GIS methods) and genotyped (using 12 microsatellite markers) all the incubated *mancae*. This methodology permitted to obtain spatio-genetic maps describing heterozygosity and spatial distribution of *mancae* and of multipaternity within the marsupial landscape. We discussed the interest of this kind of multidisciplinary approach which could improve in this case our understanding of sexual selection mechanisms in this terrestrial crustacean. Beyond the interesting model-focused insights, the main challenge of this study was the transfer of GIS techniques to a microscopic scale and our results appear so as pioneers rendering GIS tools available for studies involving imagery whatever their study scale.

Keywords Spatial analyses · Microsatellite markers · *Marsupium* · Seminal receptacle · Sexual selection

Nicolas Bech and Charlotte Depeux are co-first authors.

✉ Nicolas Bech
nicolas.bech@univ-poitiers.fr

[1] UMR CNRS 7267; Laboratoire Écologie and Biologie des Interactions; équipe Écologie, Évolution, Symbiose; Bâtiment B8-B35. 5, rue Albert Turpain TSA 51106, 86073 POITIERS CEDEX 9, France

Introduction

Since always, the shape of the Earth has fascinated humans, and notably Plato (fifth century BC) and Aristotle (fourth century BC) which, during the antiquity, had already suggested the sphericity of the Earth. Later, in 276 BC, Eratosthenes was the first to estimate the diameter of our planet. Today, the development of increasingly sophisticated techniques in satellite imagery and concomitantly in geolocalisation allowed to obtain photography of Earth with an increasing resolution. The treatment of these aerial photographs allows to expend the exploration of the diversity of Earth landscapes through studying the shape of shores, the surface of continental areas as well as oceanic ones but also the global Earth ellipsoid. For this vast variety of applications, geographic information system (GIS) tools are usually designed specifically to illustrate, analyse and integrate geographic or spatial data. Thus, GIS is employed in a diversity of domains such as geography, navigation, geomarketing, hydrography, agroforestry and agriculture. Moreover, as a main tool used in landscape ecology, GIS can also contribute to population and habitat management and notably to delineate management and conservation units (Crandall et al.

Published online: 20 September 2017

2000; Moritz 2002). Whatever the domain of application, such studies were always performed, at least until now, at a macroscopic spatial scale aiming to manage territories and landscapes of the Earth.

In ecology, beyond its efficiency in landscapes analysis, GIS can be combined with a genetic approach in order to provide information about the interaction between landscape features and micro-evolutionnary processes (Manel et al. 2003). Known as landscape genetics, this interdisciplinary approach allows to quantify the effect of landscapes composition and configuration on gene flow and even on spatial genetic variations (Holderegger and Wagner 2006; Storfer et al. 2007). Surprisingly, it seems that no study employing GIS has took up the challenge to change scale while it seems possible and could permit to address numerous questions relating to physiology or behavioural ecology. In this study, we tested an original and innovative approach combining GIS and molecular tools to explore physiological processes.

Evolutionary pressures resulting from the emergence of terrestrial life led to numerous physiological modifications. Among them, the appearance of internal fertilisation is associated to the emergence of various organs and structures (Parker 1970). Internal fertilisation allowed terrestrial species to maintain embryos in an aqueous environment during their development and until their hatching. Moreover, internal fertilisation also favoured the encounter of gametes, whose fusion occurs inside the female reproductive tract. In concert with anisogamy, which results in females allocating proportionally a bigger part of their resources than males to the development of their gametes (Bateman 1948; Clutton-Brock and Vincent 1991), internal fertilisation contributes to make females the "restricted resource" and so the "sex of mate choice" (Kokko and Jennions 2008; Trivers 1972). In order to enhance their fitness, females usually select males performing the best in displaying particular traits. Among the criteria able to orientate mate choice, the vast majority of studies focused on pre-mating criteria such as morphological characteristics or nuptial gifts from males. Nevertheless, more and more studies highlight a female choice for male genetic characteristics leading to an increased diversity in offspring (Beltran et al. 2008; Kempenaers 2007). Indeed, fitness has often been found to be correlated with genetic diversity (Chapman et al. 2009), and especially with individual heterozygosity, which brings advantages in terms of environmental adaptations (Van Valen 1973). Female enhancement of offspring genetic diversity can be realised through mating with several males (i.e. multipaternity) (Yasui 1998). In addition, females can use post-mating mechanisms such as cryptic choice in order to select the males whose sperms will access to fertilisation (Birkhead 1998; Eberhard 1996). Cryptic female choice has been favoured by the emergence of internal receptacles enabling sperm storage from different males and making possible, at the same time, multiple inseminations and so a cryptic choice for the best father(s) (Parker 1970). These seminal receptacles represent an important competition site at the intra-sexual (i.e. sperm competition) as well as at the inter-sexual scales (i.e. partner choice) (Andersson and Simmons 2006). These seminal receptacles occur in numerous *taxa* from mammals to arthropods (Mazzei et al. 2014). In this context, our study focused on internal fertilisation to test our multidisciplinary approach including genetics and GIS.

Among arthropods with a seminal receptacle, terrestrial isopods present the particularity of possessing a *marsupium*, only present in reproductive females. This structure consists of a ventral pouch spread from segments S2 to S5, allowing the offspring to develop independently of an external water source (Appel et al. 2011). The fertilised eggs evolve in the *marsupium* into embryos, then into *mancae* until the last pair of legs (i.e. pereiopods) appears after they hatch during the *marsupium* opening (Surbida and Wright 2001). As the *marsupium* receives the fertilised eggs upon leaving the seminal receptacle, we can expect that the spatial distribution of the *mancae* within the *marsupium* landscape could trace fertilisation chronology and could potentially reflect the hierarchical access of the different sperms having acceded to the fertilisation. Thus, in evolutionary biology, the cartography of the *mancae* within the *marsupium* combined with the genetic inference of their respective father(s) could enhance the comprehension of sexual selection mechanisms.

The common woodlouse *Armadillidium vulgare* represents an adequate model for this kind of experiments as it displays a polygynandrous mating system with successive inseminations (Moreau et al. 2002; Valette et al. 2017; Verne et al. 2007). Females can store sperms from previous matings, and their use in successive clutches is likely to result in high levels of multiple paternity during female relatively long lifespan (up to 3 years under laboratory conditions). *Armadillidium vulgare* is all the more interesting as sexual selection seems to involve a male preference for genetically dissimilar female partners (Durand et al. 2015) and a higher paternity success for more heterozygous males (Durand et al. 2017). These mechanisms could lead to an increase of offspring genetic diversity and so potentially to a better fitness for the female. So, in *A. vulgare*, the seminal receptacle combined with the *marsupium* could be the structures testifying the mechanisms of sexual selection (cryptic female choice, sperm competition…).

In this study, we tested our original and innovative approach combining GIS and molecular tools for the analysis of offspring resulting from controlled crosses between males and females. More precisely, the spatial approach allowed us to map each *manca* within the *marsupium* using GIS tools, and the genetic approach allowed us to estimate genetic diversity and to infer the father of each *manca* using 12 microsatellite markers. The main challenge of this study,

never previously realised, lies in the transfer of GIS tools, usually used at the macro landscape scale, to the physiological one. We tested this multi-disciplinary approach to investigate whether the spatial distribution of *mancae* and their inferred respective fathers reflected the chronological order in which males were experimentally proposed to the females.

Materials and methods

Sampling and cartography

To test the feasibility and the efficiency of our multi-disciplinary approach, we performed experimental crosses with three virgin females and 12 virgin males belonging to the species *A. vulgare*. All the animals used in the experiment were 1 year old and originated from a natural population collected in Denmark (Helsingör) in 1982. Since sampling, specimens have been maintained and crossed being careful to maintain genetic diversity. Individuals were kept in boxes on moistened compost under laboratory-controlled conditions [Poitiers (France) natural photoperiod; 46°34′55″N; 0°20′10″E] at 20 °C with food *ad libitum* (i.e. slices of fresh carrots and dried leaves of linden, *Tilia* sp.). In the frame of this study, experimental individuals were submitted to a stimulating photoperiod (18:6 L:D) to trigger reproduction. We isolated three virgin females in separate boxes and crossed each of them with four consecutive randomly chosen virgin males. More precisely, during day 1 we proposed one first male to each female. This first male was replaced on day 2 by a second male, which was replaced on day 3 by a third male which in turn was replaced on day 4 by a fourth and last male. According to Moreau et al. (2002), in *A. vulgare*, 1 day of exposition is enough for females to mate, so we hypothesised that each female could have mated with the four proposed males. Under the uncertainty that experimental females mated with the proposed males, we also used a fourth female (named control female) coming from a previous independent experiment (Durand et al. 2017) and which had previously given birth to a first clutch containing *mancae* from two different males (for which the chronology of mating was unknown). We followed the second incubation of this fourth female as a control in which we strongly expected to observe multipaternity, as *A. vulgare* females can store sperms in the seminal receptacle and use them for a second clutch. This control female was used only to investigate the effect of multipaternity on *mancae* distribution within the *marsupium*, but no study on genetic diversity was performed on this clutch as the female came from an experiment which was not specifically designed to this end.

After 3 weeks of incubation, when the *mancae* were 1 week from hatching from the *marsupium*, we dissected the *marsupium* in order to collect each *manca* which were later individualised in a PCR plate. Concomitantly to their sampling, we observed the position of each *manca* in the *marsupium* and localised it on a map representing a woodlouse body. We placed each *manca* in accordance with its position in relation to a median longitudinal axis of the ventral body surface and the segmentation (i.e. the number of corresponding pereionite, from 2 to 6). Indeed, even if the marsupium spreads over between segments 2 and 5, a great number of eggs can create a bulge on the 6th segment. We performed this cartography using the QGis software v.2.12.0 (QGis development team 2015) where the drawing of female woodlouse body was implemented as a raster file. We derived the RGF93/Lambert 93 ESPG: 2154 coordinate system in order to scale the female woodlouse body and to allow spatial analyses to be run. Finally, the perimeter surrounding the mapped *mancae* allowed us to obtain the shapes of each four analysed *marsupia*.

Molecular analyses

Genotyping

In order to determine the genetic profiles of each individual involved in this study, we extracted DNA from all females, males and *mancae* (n = 578 individuals). For the adults, we collected and crushed a leg in 120 µL bi-distilled water, 5 µL of proteinase K and 80 µL of Chelex 100 resin at 5%. DNA from the *mancae* was extracted with the same protocol excepted that the crushing step was not needed. All samples were analysed using a panel of 12 microsatellite molecular markers previously developed: Av1, Av2, Av3, Av4, Av5, Av6, Av,8, Av9 (Verne et al. 2006), AV0018, AV0032, AV0056 and AV0063 (Giraud et al. 2013) (Table 1). These markers were amplified as described by Durand et al. (2015) using the Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Basel, Switzerland), i.e. according to the manufacturer's standard microsatellite amplification protocol in a final volume of 10 µL and with an annealing temperature of 57 °C. Microsatellites markers were gathered into three multiplexes (Table 1). Then, PCR products were sent to GENOSCREEN (Lille, France) for electrophoresis on an automatic sequencer (ABI). Genotypes were determined using GENEMAPPER 3.7 software (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) and in accordance with the GENESCAN 500 LIZ dye size standard.

Genetic analyses

Based on genotyping data, we used the software MICRO-CHECKER v2.2.3. (Oosterhout et al. 2004) in order to identify the presence of null alleles or scoring errors due to stuttering. We also tested for departures from Hardy Weinberg expectations and linkage disequilibria using exact tests, based on Markov Chain (12,000 iterations) as implemented

Table 1 Main characteristics of microsatellite molecular markers used in this study

Locus	Accession number	Primer sequences (5′–3′)	Size intervals (pb)	Dye	Multiplex	First description	PHt	Fis
Av1	DQ234304	F: TGGAGTCAACTCACA TTCTG	107–115	6-FAM	1	Verne et al. (2006)	0.62	0.125
		R: TGTCTGTAAAACTTG TGCTACG						
Av2	DQ234305	F: TGAAGTTCGGGTGAA TTGTG	156–176	6-FAM	1	Verne et al. (2006)	0.433	0.01
		R: ATACCATGACGTGTC GCAAG						
AV4	DQ234307	F: CCGAACCTTTCGAAG GTATT	188–248	6-FAM	1	Verne et al. (2006)	0.617	0.444*
		R: AAGGCACATAACATT TTCACAAA						
Av5	DQ234308	F: CGTGCGAAGTTCAGA TTCTTT	261–437	6-FAM	1	Verne et al. (2006)	0.779	0.339*
		R: GCGCGCTCGAGGATT TAC						
Av9	DQ234312	F: TCTCGAAGAATTGCC TCACA	164–204	HEX	1	Verne et al. (2006)	0.366	0.298
		R: CGATGACTGGGACAA TCTCA						
Av3	DQ234306	F: TGAGTCTCATTATAG TTTGGATGA	184–234	6-FAM	2	Verne et al. (2006)	0.574	0.0004
		R: TCCTCTCTATACCCC ATAATTTCA						
Av6	DQ234309	F: GGAATGAGGTCGTCG ACTATG	163–177	6-FAM	2	Verne et al. (2006)	0.653	−0.224
		R: GTCTTTCAAACGGGC ACAAT						
Av8	DQ234311	F: CAACATCCTAATATT CAGTTCTCA	123–189	HEX	2	Verne et al. (2006)	0.796	0.2
		R: AGTTTACAGAATACG GCTGAGG						
AV0056	10.5061/dryad.md545	F: TTCAAAGGAGCGTTT GACCT	198–224	6-FAM	3	Giraud et al. (2013)	0.729	−0.058
		R: AACCACAGCAACAAC AGCAG						
AV0032	10.5061/dryad.md545	F: TTTCAACCTTCCTAA CCAAACC	87–113	NED	3	Giraud et al. (2013)	0.679	0.074
		R: TTGTTTTATATCCAC GACCATCC						
AV0063	10.5061/dryad.md545	F: CAAAACATCTGTACG GATTCCC	129–145	NED	3	Giraud et al. (2013)	0.268	−0.172
		R: GCCAAACATAAATGC TCGCT						
AV0018	10.5061/dryad.md545	F: GAAGAAATTCAAACT TCACCATC	97–136	HEX	3	Giraud et al. (2013)	0.619	−0.246
		R: CTTTGAACAGACTTA CGAATAACATC						

PHt mean observed heterozygosity, *Fis* fixation index, computed from all females, males and *mancae* (n = 578 individuals) involved in this study
*associated p-value < 0.05

in the software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2001). We adjusted the significance threshold for multiple tests applying the Bonferroni correction.

We computed the number of alleles for each marker, then the proportion of heterozygous loci (PHt) for each female, male and *mancae* involved in this study, as their

number of heterozygous loci divided by their total number of genotyped loci. This index ranges from 0 (i.e. no heterozygous locus) to 1 (i.e. all heterozygous loci). We computed this index using the GENHET R package (Coulon 2010).

We did not observe the reproductive sequences because this study did not focus on mating behaviours but rather on the number of reproductive males. Thus, according to the genotypes of the different males proposed to each female and those of *mancae*, we inferred the father of each *manca* using the software COLONY v.2.0.6.1 (Jones and Wang 2010). With 4936 iterations, this software compared the number of allele shared between the *manca* and different crossed males and allowed to determine the most likely father. This method allowed us to determine the contribution of each experimentally proposed male to the offspring of each of the four females (i.e. multipaternity).

Spatial analyses

Mancae distribution within the marsupium

Based on the cartography of the *mancae* recorded during the dissections, we determined the centroids of each *manca* using the plugin 'polygon centroids' implemented in QGis. This enabled analyses on *mancae* distribution. Besides, we analysed the spatial distribution of *mancae* within the *marsupium* for each of the four involved females. Firstly, we used the Heatmap plugin implemented in the QGis software in order to visualise the spatial distribution of *mancae* densities within *marsupia* (taking into account a radius of 1 mm). Even if heatmaps allow easy identification of hotspots and clustered points, this method is not supported by statistical tests. Thus, beyond the global representation of *mancae* spatial distribution, we used the cartography tools combined with the natural segmentation and the median longitudinal axis of the ventral body surface of the woodlouse to divide the *marsupium* in different parts. This allowed us to count the *mancae* found within the right and left parts of the *marsupium* but also found within pereionites S2, S3, S4, S5 and S6 of the pereion. We compared the quantity of *mancae* among the five segments using a Friedman test with the function "friedman.test", and between the right and left parts using a Wilcoxon test with the function "wilcoxon.test" in the package "stats" (RCoreTeam 2015). Multiple comparisons were then performed between segments using the function "posthoc.friedman.conover.test" in the package "PMCMR" (Pohlert 2014) with a Bonferroni correction. We performed these analyses using R v.3.2.2 (RCoreTeam 2015).

Multipaternity distribution within marsupium

Based on *mancae* distribution and on their respective father previously inferred from genotyping, we analysed the distribution of potential multipaternity within the *marsupium* of the four females. We used the Nearest Neighbor Analysis implemented in the QGis software to determine if the *mancae* sharing the same father displayed a random, a clustered (i.e. aggregation) or a dispersed distribution within the *marsupium*. A dispersed distribution reflects a spatial pattern of points which are all equidistant from each other, while a random one reflects a spatial pattern of points which can be both randomly close or distanced. This method computed the average distance between each *manca* and the nearest *manca* sharing the same father and compared this distance with the expected average distance if paternities were randomly distributed. Results produced a 'nearest neighbour index' which was lower or greater than 1 if paternities showed respectively a clustered or dispersed distribution. This 'nearest neighbour index' was associated to a Z-score index whose value is correlated with statistical p-values. Thus, the 'nearest neighbour index' combined with the Z-score index allowed us to test whether, in the multipaternity cases, *mancae* from the same father occupied the same area within the *marsupium* or not. This test permitted to test whether the multipaternity showed a random, a clustered or a dispersed distribution within the *marsupium*. The underlying expectations were to determine if the spatial distribution of the paternities could be the reflection of the fertilisation order.

Genetic diversity distribution within the marsupium

Based on *mancae* distribution and on their respective heterozygosity (i.e. PHt) previously determined, we analysed the spatial distribution of the genetic diversity within the *marsupium* of the three experimental females. We excluded from this analysis the control female because she did not undergo the same experimental procedure as the experimental ones. Indeed, we can expect different evolutionary pressures on cryptic choice between the first clutches, monitored in experimental females, and the second ones, monitored in the control female. We used the inverse distance weighted interpolation, implemented in the software QGis, to spatially interpolate and visualise the distribution of the PHt. We combined this interpolation with the Moran's index, a statistical measure of spatial autocorrelation. Taking into account heterozygosity distribution, this approach allowed us to test for the presence of hotspots and thus to determine if genetic diversity varied according to its localisation within the *marsupium*.

Results

All microsatellite markers were polymorphic and showed a number of alleles ranging from 2 to 7. We detected no linkage disequilibrium among markers (adjusted p-value threshold = 0.00076) but deviations from Hardy Weinberg expectations have been highlighted for the markers Av4 and Av5 which showed a heterozygote deficiency. Moreover, we also detected null alleles for these markers, as well as for Av3 and AV0056 markers (Table 1). This seems to result from the sampling which encompassed genetically close individuals (i.e. belonging to the same clutches, which has an impact on genotypic frequencies) rather than from genotyping errors. Thus, we kept all microsatellite markers in the following analysis.

From *marsupium* dissections, we obtained respectively 60, 124 and 242 *mancae* for the three experimental females. The control female incubated 136 *mancae*. Thus, a total of 562 *mancae* have been analysed in this study. According to the heatmaps (Fig. 1), the *mancae* seem to be mainly distributed in the anterior part of the *marsupium*. This result was corroborated by statistical analyses showing a significant difference in the quantity of *mancae* between the different segments (Friedman $Chi^2 = 13.31$, df = 4, p-value = 0.010). Indeed, segments S2, S3 and S5 contained significantly more *mancae* than the sixth one (respectively: p-value < 0.001, p-value = 0.003, p-value = 0.008) and segment S2 contained more *mancae* than the fourth one (p-value = 0.022), with no other significant difference between other segments (p-values > 0.05 for other pairwise comparisons, Fig. 2a). However, no difference in the quantity of *mancae* was detected between the right and left parts of the *marsupium* (W = 7.5, p-value = 1) (Fig. 2b).

As COLONY software required that at least two microsatellites were scored, it was not possible to infer the father for some *mancae* presenting no data after genotyping. Thus, out of 426 *mancae* for the three experimental females, COLONY inferred fathers for 381 *mancae*. Only one father was detected in the offspring for two experimental females, and two fathers for the third female (Table 2). All experimental females mated with the first proposed male, and the third female mated with the third male as well. In this case 167 *mancae* were fathered by the first male and 38 *mancae* by the second one, the father of 37 *mancae* remaining undetermined (Table 2). As expected, analyses inferred two fathers in the clutch of the control female, which respectively fathered 100 and 30 *mancae*, 6 *mancae* remaining without inferred father. However, in both females fertilised by two different males (i.e. the third experimental female and the control one) (Fig. 3), we highlighted no significant spatial clusterisation of the paternities within *marsupia* (nearest neighbour indices = 1.24 and 1.07 with associated Z-scores = 4.52 and 0.715 for respectively both males having fertilised the control female ; Nearest neighbour indices = 1.003 and 0.967 with associated Z-scores = 0.0772 and − 0.3954 for respectively both males having fertilised the third experimental female). Only the *mancae* from the first male having fertilised the control female showed a dispersed spatial distribution. All other *mancae* from the same father were randomly distributed within *marsupia* as suggested by Z-scores corresponded to p-values > 0.10.

With regards to male heterozygosity, it appears that in the two cases where the experimental female mated only with the first proposed male, this male was the one with the highest PHt value of all males proposed to the female. Conversely, for the remaining female which mated with both the

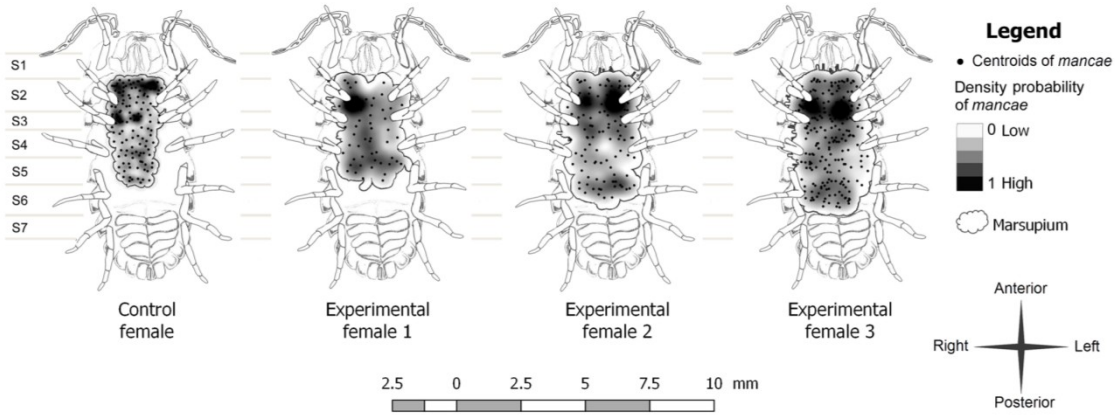

Fig. 1 Heatmaps representing, in ventral view of *A. vulgare* and associated segments (i.e. S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S7), the spatial distribution of the density probability of *mancae* within the *marsupium* of the control and experimental females. These heatmaps were realised with QGis software

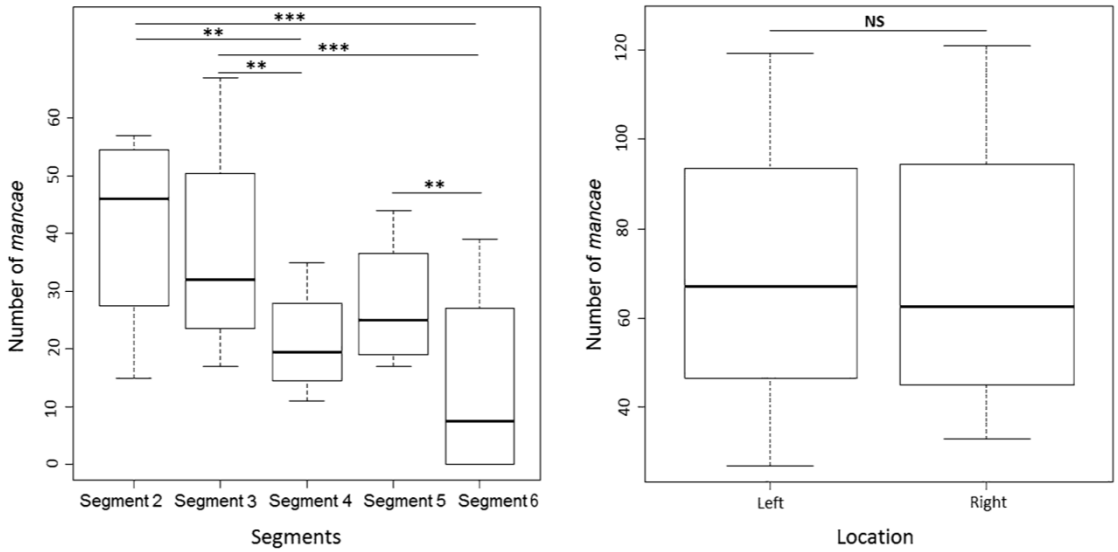

Fig. 2 Box and whisker diagrams representing the number of the *mancae* found into the different parts of the *marsupium* of the four females; **a** according to different segments (S2, S3, S4, S5 and S6) and **b** according to left and right parts. Lines in bold, within the boxes, show the median and lines, extending vertically from the boxes, indicate variability outside the upper and lower quartiles. ***p-values < 0.001; **p-values < 0.01; *p-values < 0.05 and *NS* non significant

Table 2 Genetic profiles and results of cross-breeding for the experimental individuals. Male numerotation corresponds to the order in which they were presented to females

Female ID	Male ID	Adult PHt	Number of *mancae*	Mean *mancae* PHt
Experimental female 1	-	0.417	60	0.421
	Male 1	0.583	58	0.421
	Male 2	0.417	0	–
	Male 3	0.583	0	–
	Male 4	0.583	0	–
Experimental female 2	-	0.667	124	0.551
	Male 1	0.75	118	0.551
	Male 2	0.583	0	–
	Male 3	0.417	0	–
	Male 4	0.417	0	–
Experimental female 3	-	0.83	242	0.514
	Male 1	0.417	167	0.507
	Male 2	0.417	0	–
	Male 3	0.583	38	0.538
	Male 4	0.417	0	–

first and the third male, the more heterozygous male was the third one. Concerning the spatial distribution of *mancae* heterozygosity, whatever the females, we did not obtain a significant spatial hotspot. This suggests that genetic diversity does not vary according to the localisation of *mancae* within the *marsupium* (Moran's index: p = 0.8, p = 0.57, p = 0.14 for experimental females) (Fig. 4).

Discussion

Our multi-disciplinary study shed lights on mechanisms of offspring development and of sexual selection in *A. vulgare*. (1) Even if the *marsupium* is located downstream of seminal receptacle and receives just fertilised eggs, offspring are mainly located in the anterior part of the *marsupium*. (2) Experiments also showed that multipaternity can occur in *A. vulgare* without being systematic and (3) without any organisation following the chronological order of matings. (4) Besides, we observed that males displaying a high level of heterozygosity seem to obtain more offspring compared to males with low level of heterozygosity. However, our small sampling makes such conclusion very speculative.

1. With a total of 562 *mancae* analysed, this study allowed us to highlight *mancae* spatial distribution, as they are mainly located in the anterior part of the *marsupium* of analysed females. This suggests that *mancae* were pushed from a posterior to an anterior position and more precisely from the genital opening to an anterior position, as genital apertures are situated on the 5th pereion-

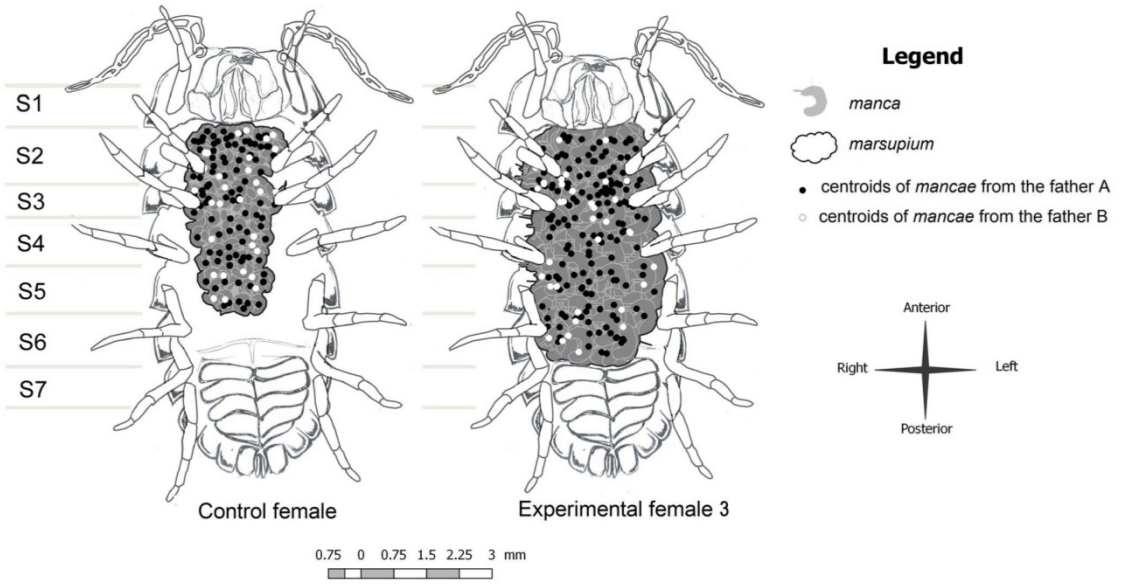

Fig. 3 Spatio-genetic maps representing, in ventral view of *A. vulgare* and associated segments (i.e. S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S7), the spatial distribution of multipaternity within *marsupia* of the control female and experimental female 3 for which two males contributed to offspring. For experimental female 3, father A was the male who mated first

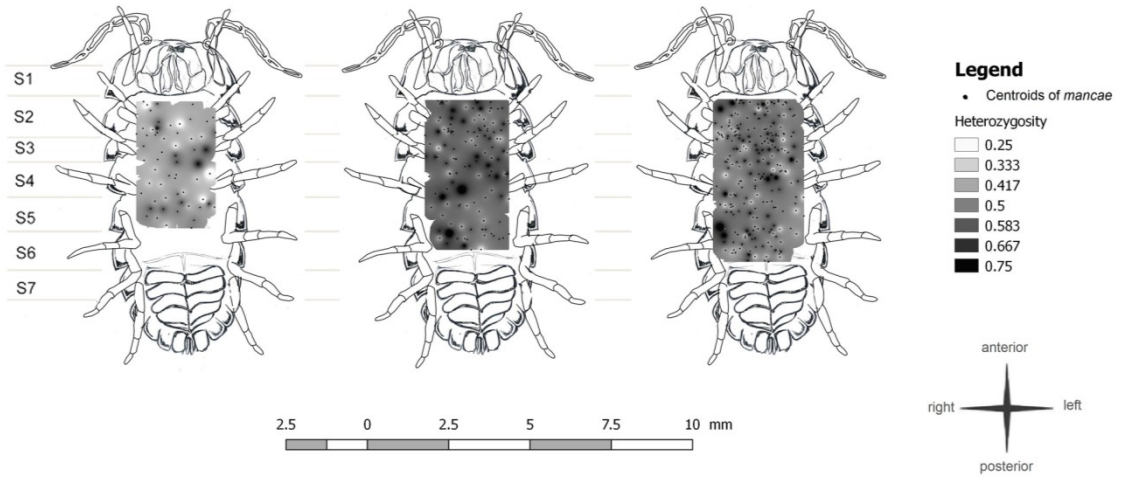

Fig. 4 Inverse distance weighted interpolations representing, in ventral view of *A. vulgare* and associated segments (i.e. S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S7), the spatial distribution of the observed heterozygosity (PHt) computed for each *manca* using 12 microsatellite markers. These interpolations were realised with QGis software

ite. A first hypothesis can be that the major location in an anterior position results from the *marsupium* being deeper in this anterior part. However, to our knowledge, such difference in depth according to segment number, has never been observed. Besides, the marsupial shape could limit the cavity depth (Appel et al. 2011). Indeed, there is no protrusion of the *marsupium* towards outside the body, so that sternites arch towards the body cavity to make room for the *mancae* (Appel et al. 2011). This particularity allows *A. vulgare* to perform conglobation

(i.e. rolling-up behaviour), used as water balance and defence tactics against predators (Hornung 2011). This conglobation could also condense eggs into the anterior part of the *marsupium* (Appel et al. 2011; Csonka et al. 2015). The important *mancae* concentration on the anterior part could be thus the result of the anatomic adaptations of conglobation in *A. vulgare*.

2. All four females produced offspring but only the control female and a single experimental one showed multipaternity. Thus, our results from these crosses corroborated the polygynandrous mating system already described in *A. vulgare* (Moreau et al. 2002; Valette et al. 2017) but also supported that, in a short term period as in our experiment, multipaternity is not systematic (Durand et al. 2017). According to Moreau et al. (2002), recently fertilised females are more likely to refuse mating attempts with other males than virgin females. Thus, given our protocol, it is possible that males were proposed in too close time sequences to allow females to mate again. However, in all cases, females mated with the first experimental proposed male, suggesting that females insure offspring with the first encountered male, and choice may take place from the moment the female encounters at least another male. As a consequence, there would be a positive effect of the precedence insuring reproductive success to the first encountered male.
3. The location of the *mancae* belonging to different fathers seems to be determined during the post-fertilisation migration. If eggs migrate towards the anterior part of the body, a structured organisation could be observed in case of ordered fertilisation with precedence of males. Fertilisation occurs when the oocytes pass through the seminal receptacle upon leaving the ovary (Ziegler and Suzuki 2011). The seminal receptacle forms a ring in which spermatozoa are stored in accumulation of layers, but nothing is known about a potential organisation of spermatozoa according to the male, as it is suggested in spiders (Kaster and Jakob 1997). If the layers were structured following the chronological order of matings, and if fertilisation order depended on this structure, the first male would fertilise all the first *mancae* which should migrate towards the anterior part of the *marsupium*, which is not observed in our study. Thereby, the absence of organisation in the *marsupium* could be the result of a lack of organisation in the seminal receptacle. Conversely, fertilisation could also occur independently of the organisation of the seminal receptacle. A non-exclusive hypothesis could be a post-laying spatial random reorganisation of *mancae* within the *marsupium*. This reorganisation could result from mother conglobations or from the rearrangement of embryos during the first part of development (i.e. during the increase of their volumes).
4. According to our results, in the only case where an experimental female produced offspring with a second male, this one displayed a higher heterozygosity than all other proposed males, including the first male which mated. Quite by chance, in the other cases, the first males displayed the highest heterozygosity index of all the proposed males. The small females sampling does not allow us to conclude, but this result suggests that paternity success could be linked to male level of heterozygosity, hypothesis previously reached after a previous experiment where two males were simultaneously proposed to a female (Durand et al. 2017). This influence of genetic heterozygosity on paternity success could be the result of non-exclusive and inseparable pre- and post-copulatory mechanisms of intersexual (i.e. mate choice) and/or intrasexual (i.e. male–male competition) selection. Observing mating sequences before studying the precedence of males and distribution of the offspring could shed lights on these evolutionary sexual selection strategies.

Conclusion

Designed for a microscopic scale, this pioneer study demonstrates the possibility of using spatial statistics and other techniques borrowed from geomatics for studies involving imagery whatever the study scale. More generally, this study connects and inserts the great diversity of GIS tools within the framework of studies involving treatments of imageries whatever the origin of rasters, including those which do not represent a map georeferenced in an available geodesic system. From this insight, GIS and associated spatial analyses appear available and all the more interesting for describing biological phenomena within a scale gradient ranging from gene to cell. For instance, at a gene scale, spatial analysis could describe the jumping destination of transposable elements into the vast and virtual genome landscape. In the same way, at a cellular scale, GIS tools could help to test statistically the spatial distribution of several types of molecules in relation to others, notably through phenomena highlighted by FISH methods. Herein, even if the lack of sampling does not allow us to conclude about the mating behaviour of *A. vulgare*, the export of GIS mapping techniques permitted us to better characterise mating strategies in *A. vulgare* at the physiologic scale by monitoring multipaternity, and to bring lights on sexual selection mechanisms in this terrestrial crustacean.

Acknowledgements We would like to thank Cybèle Prigot for her participation to discussions as well as Christine Braquart-Varnier, Richard Cordaux and Didier Bouchon for their constructive comments. The funding is partly granted by the following 2015–2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER), the European Regional

Development Fund (FEDER) and the partnership arrangements in ecology and the environment (DIPEE). This work was supported by the french Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the CNRS.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Andersson M, Simmons LW (2006) Sexual selection and mate choice. Trend Ecol Evolut 21:296–302

Appel C, Quadros AF, Araujo PB (2011) Marsupial extension in terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). Nauplius 19:123–128

Bateman AJ (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. Heredity 2:349–368

Beltran S, Cézilly F, Boissier J (2008) Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. PLoS One 3:e3328

Birkhead TR (1998) Cryptic female choice: criteria for establishing female sperm choice. Evolut Int J Org Evolut 52:1212–1218

Chapman JR, Nakagawa S, Coltman DW, Slate J, Sheldon BC (2009) A quantitative review of heterozygosity–fitness correlations in animal populations. Mol Ecol 18:2746–2765

Clutton-Brock T, Vincent AC (1991) Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. Nature 351:58–60

Coulon A (2010) Genhet: an easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. Mol Ecol Resour 10:167–169

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. Trend Ecol Evolut 15:290–295

Csonka D, Halasy K, Hornung E (2015) Histological studies on the marsupium of two terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). ZooKeys 515:81–92

Durand S, Beauché F, Richard F-J, Beltran-Bech S (2015) How do females' genetic characteristics influence male mate preference in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*? Ethology 121:1122–1130

Durand S, Cohas A, Braquart-Varnier C, Beltran-Bech S (2017) Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*. Behav Ecol Sociobiol 71:1–10

Eberhard WG (1996) Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton

Giraud I, Valette V, Bech N, Grandjean F, Cordaux R (2013) Isolation and characterization of microsatellite loci for the Isopod Crustacean *Armadillidium vulgare* and transferability in Terrestrial Isopods. PLoS One 8:e76639

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). http://www2.unilch/popgen/softwares/fstat.html. Accessed 19 Sept 2017

Holderegger R, Wagner HH (2006) A brief guide to landscape genetics. Landsc Ecol 21:793–796

Hornung E (2011) Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: structure, physiology and behavior. Terr Arthropod Rev 4:95–130

Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Mol Ecol Resour 10:551–555

Kaster JL, Jakob EM (1997) Last-male sperm priority in a haplogyne spider (Araneae: Pholcidae): correlations between female morphology and patterns of sperm usage. Ann Entomol Soc Am 90:254–259

Kempenaers B (2007) Mate choice and genetic quality: a review of the heterozygosity theory. Adv Stud Behav 37:189–278

Kokko H, Jennions MD (2008) Parental investment, sexual selection and sex ratios. J Evol Biol 21:919–948

Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trend Ecol Evolut 4:189–197

Mazzei V, Longo G, Brundo MV (2014) Spermiophagic activity in the female genital system of some species of terrestrial isopods (Crustacea, Halophilosciidae). Tissue Cell 46:255–259

Moreau J, Seguin S, Caubet Y, Rigaud T (2002) Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial crustacean. Anim Behav 64:569–577

Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. Syst Biol 5:238–254

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol 4:535–538

Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biol Rev 45:525–567

Pohlert T (2014) The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package, pp 2004–2006. http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR

RCoreTeam (2015) R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria

Storfer A, Murphy MA, Evans JS, Goldberg CS, Robinson S, Spear SF et al (2007) Putting the 'landscape' in landscape genetics. Heredity 98:128–142

Surbida KL, Wright JC (2001) Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare*. (Isopoda: Oniscidea). Physiol Biochem Zool 74:894–906

Trivers R (1972) Parental investment and sexual selection. In: Sexual selection and the descent of man. B. Campbell ed., Chicago

Quantum GIS Development Team (2015) Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. http://qgis.osgeo.org

Valette V, Durand S, Bech N, Grandjean F, Beltran-Bech S (2017) Multiple paternity in a wild population of *Armadillidium vulgare*: influence of infection with *Wolbachia*? J Evolut Biol 30:235–243

Van Valen L (1973) A new evolutionary law. Evolut Theory 1:1–30

Verne S, Puillandre N, Brunet G, Gouin N, Samollow PB, Anderson JD, Grandjean F (2006) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Mol Ecol Notes 6:328–330

Verne S, Moreau J, Caubet Y, Bouchon D, Johnson M, Grandjean F (2007) Male mating success during parturial intermoults in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* revealed by the use of a microsatellite locus. J Crustac Biol 27:217–219

Yasui Y (1998) The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. Trend Ecol Evolut 13:246–250

Ziegler A, Suzuki S (2011) Sperm storage, sperm translocation and genitalia formation in females of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Peracarida, Isopoda). Arthropod Struct Dev 40:64–76

Annexe 3 : Protocole extraction ADN en vue de génotypage de SNP par GBS

Cette extraction a été réalisée à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen. Le protocole a été adapté pour le cloporte par I. Giraud (EES) dans l'objectif de réaliser des librairies de bonne qualité avant séquençage du génome. Nous avons réparti les différents tissus collectés sur trois colonnes différentes pour un même individu, ce qui permet de maximiser le rendement de l'extraction, en évitant des phénomènes de saturation des colonnes et ainsi des pertes d'ADN.

a) Dissections et lyse des protéines et de l'ARN

Les animaux ont été disséqués dans de la solution Ringer pour isopode immédiatement après la sortie du congélateur, pour éviter une décongélation qui, même très brève, conduit à une dégradation de l'ADN. Pour chaque animal, (i) la tête, (ii) les pattes et (iii) la chaine nerveuse ainsi que les gonades ont été déposées respectivement dans trois tubes contenant 180 µL du tampon de lyse ATL fourni. La tête et les pattes ont été ciselées avec des ciseaux fins, et tous les tissus ont été broyés au piston. Vingt µL de Protéinase K (20 mg/mL) ont été ajoutés à chaque tube, mis par la suite à incuber 3 h à 56 °C en agitant de temps à autre. Après incubation, nous avons centrifugé les tubes contenant la tête et les pattes 2 min à 8000 g afin de récupérer le surnageant. Cinq µL de RNase A ont alors été déposés dans les trois tubes, placés à 37 °C pour 30 min.

b) Chargement de l'extrait sur les colonnes, lavages et élution

Après vortex, nous avons homogénéisé l'échantillon avec 200 µL de tampon AL. A ce mélange ont été ajoutés 200 µL d'éthanol 100 % glacé, et l'ensemble a par la suite été déposé sur une colonne Qiagen. Après 2 min de centrifugation à 8000 g, nous avons remplacé le tube collecteur et déposé 500 µL de tampon de lavage AW1 sur la colonne. Après une nouvelle centrifugation à 8000 g pendant 2 min, le tube collecteur a été nouveau remplacé et 500 µL de tampon de lavage AW2 ont été déposés avant une centrifugation de 3 min à 17000 g. Nous avons alors placé la colonne dans le tube final, et déposé 200 µL de tampon d'élution AE sur la membrane avant incubation 5 min à température

ambiante. Après une centrifugation à 8000 g pendant 1 min, les trois éluats de chaque individu ont été rassemblés.

c) Utilisation des extraits obtenus et contrôles

Un µL de cette solution a été utilisé pour réaliser une dilution au 20ème de l'ADN afin de servir de matrice pour les PCR sur les marqueurs microsatellites. Nous avons par la suite concentré le reste de la solution d'ADN avec des billes AMPure (Beckman Coulter), afin d'obtenir une concentration suffisante pour la méthode GBS. L'ADN a été quantifié par fixation d'un marqueur fluorescent à l'aide d'un Qubit 2.0 (Invitrogen). Nous avons également vérifié la qualité de l'ADN en faisant migrer 120 ng d'ADN dans un gel d'agarose à 0,8 % pendant 1 h à 100 V (Figure A3.1).

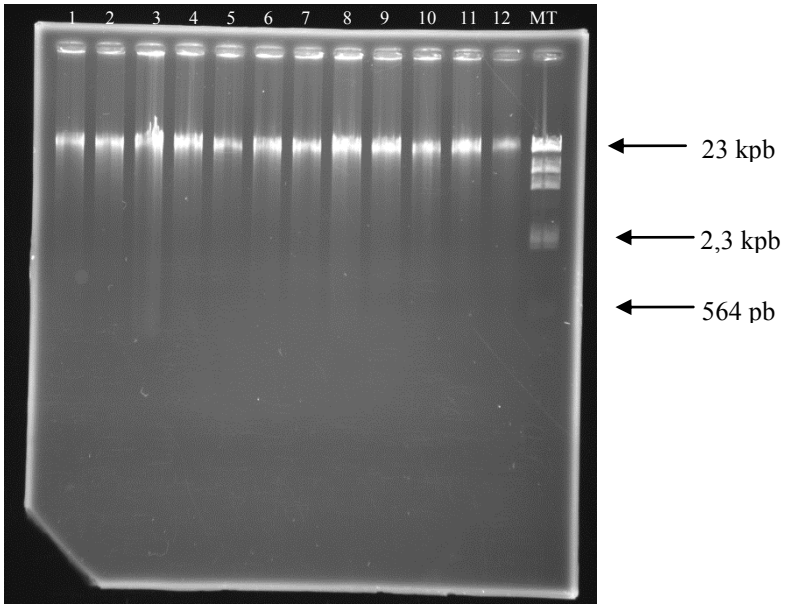

Figure A3.1 Exemple de gel de contrôle qualité après extraction avec le kit DNeasy. 1 à 12 : échantillons d'ADN. MT : marqueur de taille λ HindII. Une bande de haut poids moléculaire (23 kpb) et une absence de *smear* atteste de la bonne qualité de ces échantillons.

Annexe 4 : Récapitulatif des modèles complets et minimaux présentés dans le chapitre III partie C

A. Expérience 1

				Modèle complet			Modèle minimal		
Sous-partie	**Variable réponse**	**Effet aléatoire**	**Variables explicatives**	**χ^2**	**ddl**	**p**	**χ^2**	**ddl**	**p**
J0	Masse	Bloc	Catégorie	7,64	4	0,11	**115,4**	**4**	**<0,001**
			Hétérozygotie	2,5	1	0,11	**8,72**	**1**	**0,003**
			Catégorie : hétérozygotie	1,02	4	0,91			
	Densité hémocytaire	Bloc	Catégorie	16,21	4	0,003	**37,45**	**4**	**<0,001**
			Hétérozygotie	0,6	1	0,44			
			Catégorie : hétérozygotie	4,53	4	0,34			
	Viabilité hémocytaire	Bloc	Catégorie	5,69	4	0,22	**39,95**	**4**	**<0,001**
			Hétérozygotie	0,49	1	0,49			
			Catégorie : hétérozygotie	1,74	4	0,78			
Variations entre J0 et J7	Densité hémocytaire	Bloc/ID	Avant/après	0,91	1	0,34			
			Traitement	0,18	1	0,67			
			Traitement:Avant/après	**36,22**	**1**	**<0,001**			
	Viabilité hémocytaire	Bloc/ID	Avant/après	**11,16**	**1**	**<0,001**			
			Traitement	0,01	1	0,9			
			Traitement:Avant/après	**4,34**	**1**	**0,037**			
	Densité hémocytaire	Bloc/ID	Avant/après	7,41	1	0,007	**177,18**	**1**	**<0,001**
			Catégorie	11,14	4	0,025	**10,49**	**4**	**0,033**
			Hétérozygotie	0,33	1	0,57			
			Catégorie:Avant/après	5,13	4	0,27			
			Hétérozygotie:Avant/après	1,21	1	0,27			
	Viabilité hémocytaire	Bloc/ID	Avant/après	1,44	1	0,23	2,42	1	0,12
			Catégorie	9,72	4	0,045	**9,79**	**4**	**0,044**
			Hétérozygotie	0,05	1	0,81			
			Catégorie:Avant/après	21,76	4	<0,001	**21,29**	**4**	**<0,001**
			Hétérozygotie:Avant/après	0,25	1	0,62			
J7	Densité hémocytaire	Bloc	Catégorie	1,17	4	0,88			
			Hétérozygotie	0,78	1	0,38			
			Catégorie : hétérozygotie	1,47	4	0,83			
	Viabilité hémocytaire	Bloc	Catégorie	16,82	4	0,002	**31,51**	**4**	**<0,001**
			Hétérozygotie	3,01	1	0,08			
			Catégorie : hétérozygotie	7,75	4	0,1			
	Charge bactérienne	Bloc	Catégorie	1,6	4	0,81	**55,91**	**4**	**<0,001**
			Hétérozygotie	1,72	1	0,19	3,59	1	0,058
			Catégorie : hétérozygotie	1,66	4	0,8			
	Charge bactérienne	Bloc	Densité hémocytaire	**18,46**	**1**	**<0,001**			
	Charge bactérienne	Bloc	Viabilité hémocytaire	2,82	1	0,09			

ID : identité de l'individu
Les effets significatifs retenus dans le modèle final sont présentés en gras.

B. Expérience 2

Sous-partie	Variable réponse	Effet aléatoire	Variables explicatives	Modèle complet χ^2	ddl	p	Modèle minimal χ^2	ddl	p
J0	Masse	Bloc	Catégorie	0,51	2	0,77	**14,41**	**2**	**<0,001**
			Hétérozygotie	0,13	1	0,72			
			Catégorie : hétérozygotie	2,25	2	0,33			
	Densité hémocytaire	Bloc	Catégorie	2,92	2	20,23	**6,99**	**2**	**0,030**
			Hétérozygotie	0,07	1	0,8			
			Catégorie : hétérozygotie	2,33	2	0,31			
	Viabilité hémocytaire	Bloc	Catégorie	0,13	2	0,94			
			Hétérozygotie	0,37	1	0,54			
			Catégorie : hétérozygotie	0,19	2	0,91			
Survie	Survie	Bloc	Traitement	**8,18**	**1**	**0,004**			
	Survie	Bloc	Catégorie	7,06	2	0,029	**6,95**	**2**	**0,030**
			Hétérozygotie	4,58	1	0,032	**4,56**	**1**	**0,033**
			Catégorie : hétérozygotie	0,13	2	0,94			

Les effets significatifs retenus dans le modèle final sont présentés en gras.

Annexe 5 : Densité et viabilité hémocytaire chez les mâles et les femelles au cours d'une expérience pilote

Ces données ont été obtenues au cours d'une expérience pilote visant à vérifier au bout de combien de temps la densité hémocytaire revenait à son niveau initial après un prélèvement de 5µL d'hémolymphe. Les animaux utilisés pour ce test sont issus non pas de la lignée WXa comme pour l'ensemble des études présentées dans ce manuscrit, mais de la lignée BF, prélevée à Nice en 1967. Les animaux sont vierges, asymbiotiques et âgés de 11 mois. Cette expérience ayant été réalisée en novembre 2014, les animaux sont en période de repos sexuel.

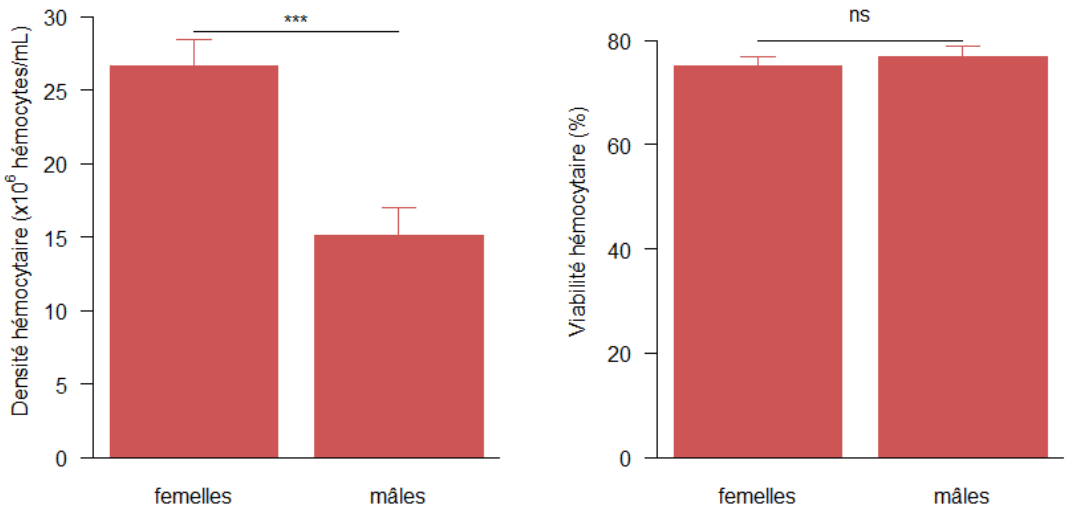

Figure A5 (A) Densité et (B) viabilité hémocytaires selon le sexe.

Mécanismes évolutifs à la base du maintien de la diversité génétique et conséquences adaptatives chez l'isopode terrestre *Armadillidium vulgare*

La diversité génétique est un paramètre capital pour les populations comme pour les individus. Ainsi, l'hétérozygotie confère généralement un avantage de valeur sélective aux individus dans de nombreux *taxa*, et il existe divers processus de sélection sexuelle permettant d'optimiser l'hétérozygotie de la descendance. Nous avons testé ces hypothèses chez l'isopode terrestre *Armadillidium vulgare*. Nous avons pu mettre en évidence un meilleur succès reproducteur des mâles les plus hétérozygotes, qui peut résulter de la compétition intrasexuelle comme du choix de partenaire, ainsi que d'un choix pour un partenaire génétiquement dissimilaire. Ces deux processus ont pour conséquence d'augmenter l'hétérozygotie des descendants. Nous avons aussi décrit pour la première fois un fort taux de paternité multiple dans les populations naturelles comme expérimentales, augmentant la richesse allélique des portées et permettant à la sélection sexuelle post-copulatoire d'avoir lieu. De plus, nous avons pu observer que les animaux les plus hétérozygotes survivent mieux face à une infection bactérienne, probablement via une meilleure tolérance. Les individus les plus hétérozygotes sont également plus gros à âge équivalent, ce qui revêt une importance particulière pour les femelles puisqu'une grande taille leur confère une meilleure fécondité. Ces résultats suggèrent que divers mécanismes sont à l'origine du maintien de la diversité génétique dans les populations d'*A. vulgare* et confèrent aux individus une meilleure valeur sélective. Ainsi les populations de cet isopode terrestre possèdent vraisemblablement un potentiel adaptatif important permettant leur maintien à long terme.

Mots clés : compatibilité génétique, traits d'histoire de vie, cloporte, crustacé, hétérozygotie, valeur sélective, sélection sexuelle

---

Evolutionary mechanisms at the basis of genetic diversity maintenance and adaptive consequences in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*

Genetic diversity is a crucial parameter for both populations and individuals. As such, heterozygosity often confers a selective advantage to individuals in numerous taxa, and sexual selection processes can result in an optimisation of offspring heterozygosity. We tested these hypotheses in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. In this work, we highlighted a higher reproductive success for more heterozygous males, which could result from both intrasexual competition and mate choice, as well as a choice for a genetically dissimilar partner. These two processes result in an increase in offspring heterozygosity. Moreover, we described for the first time a high rate of multiple paternity in natural as well as in experimental populations, increasing brood allelic richness and allowing post-copulatory sexual selection processes. Besides, we showed that more heterozygous individuals survive better when confronted to a bacterial infection, probably through a better tolerance. More heterozygous individuals are also bigger at the same age, which is particularly important in females because a big size leads to a higher fecundity. These results suggest that various mechanisms result in genetic diversity maintenance in *A. vulgare* populations and confer a better fitness to individuals. Thereby, it is likely that populations of this terrestrial isopod possess a high adaptive potential enabling their long-term maintenance.

Keywords: genetic compatibility, life history traits, woodlouse, crustacean, heterozygosity, fitness, sexual selection