

LA MINIATURISATION: UNE STRATEGIE SIMPLE DES PARASITES POUR TROMPER LEURS HOTES ? UNE ANALYSE DU SEX-RATIO EN CYTOMETRIE DE FLUX.

S. Aron

Unité des Communautés Animales, Université Libre de Bruxelles
B-1050 Bruxelles, Belgique

INTRODUCTION

Au cours des 20 dernières années, le sex-ratio chez les Hyménoptères a fait l'objet d'un nombre considérable d'études théoriques et expérimentales (Charnov et al., 1981; Charnov, 1982; Wrensch & Ebbert, 1993; Godfray, 1994; Godfray & Werren, 1996; Chapuisat & Keller, 1999; Sundström & Boomsma, 2001; Hardy, 2002; West & Sheldon, 2002; West et al., 2002). Cependant, une difficulté majeure dans l'étude du sex-ratio est la détermination des variations du sex-ratio au cours du développement. Le sex-ratio est généralement déterminé à la ponte (sex-ratio primaire) et/ou au stade adulte (sex-ratio secondaire). La différence entre le sex-ratio primaire et secondaire a une double origine. Primo, elle peut être le reflet d'une mortalité différentielle liée au sexe. Les mâles étant haploïdes, ils sont potentiellement sujets à une plus grande mortalité induite par la présence d'allèles récessifs létaux (Crozier, 1971; Smith & Shaw, 1980; Ross, 1997). Secundo, chez les espèces sociales, les variations du sex-ratio peuvent également résulter d'un conflit opposant les reines aux ouvrières quant à l'investissement optimal dans chaque sexe de la descendance (Trivers & Hare, 1976). En raison du déterminisme du sexe haplodiploïde, les ouvrières sont en effet plus étroitement apparentées à leurs sœurs qu'à leurs frères. Elles peuvent donc accroître leur succès reproductif (indirect) en favorisant un sex-ratio biaisé en faveur du sexe femelle. Par conséquent, la différence entre le sex-ratio primaire et le sex-ratio secondaire peut résulter d'un contrôle des ouvrières sur l'investissement relatif dans chacun des sexes de la descendance. Chez un grand nombre d'Hyménoptères sociaux, l'analyse du sex-ratio à l'échelle des populations révèle en effet un investissement énergétique biaisé en faveur du sexe femelle, confirmant le contrôle des ouvrières sur le sex-ratio (Bourke & Franks, 1995; Crozier & Pamilo, 1996). Plusieurs travaux ont montré que les ouvrières biaisent le sex-ratio en éliminant une partie – voire l'intégralité – du couvain mâle (Aron et al., 1994, 1995; Keller et al., 1996; Sundström et al., 1996; Chapuisat et al., 1997).

Cependant, le stade de développement auquel le couvain mâle est identifié et sélectivement éliminé par les ouvrières a une importance théorique capitale (Nonacs & Carlin, 1990). Si les ouvrières ne reconnaissent le sexe du couvain que tardivement, c'est-à-dire après avoir investi une importante quantité d'énergie aveuglément dans les deux sexes de la descendance, le coût associé à l'élimination des mâles peut devenir prohibitif. Au contraire, plus la reconnaissance des sexes est précoce, plus les ouvrières peuvent biaiser le sex-ratio en faveur de leurs propres intérêts génétiques, à un moindre coût énergétique. Malgré son importance théorique, le stade auquel les mâles sont éliminés n'a été que fort peu étudié. Ceci est principalement dû à l'extrême difficulté à déterminer le sexe de la descendance au cours de son développement. A ce jour, le stade de développement auquel le couvain mâle est éliminé par les ouvrières a été étudiée soit indirectement, via des manipulations de couvain en laboratoire (*Linepithema humile* - Passera et Aron, 1996), soit directement, à l'aide de marqueurs moléculaires (*Formica exsecta* - Chapuisat et al., 1997). Ces deux méthodes présentent plusieurs inconvénients: la première à cause de son aspect fastidieux et – surtout – son manque de précision; la seconde, à cause de son coût élevé et de ses exigences quant aux caractéristiques génétiques des reproducteurs.

Ici, je montre que la cytométrie de flux (FCM), une méthode permettant de déterminer le degré de ploïdie des cellules à partir de la quantité d'ADN nucléaire fluorescent qu'elles contiennent, permet de distinguer avec précision les individus mâles (haploïdes) des individus femelles (diploïdes) et ce, dès le premier stade larvaire. A ce jour, la méthode FCM est sans ambiguïté la plus compétitive en termes d'efficacité, de rapidité et de coût pour

déterminer le sexe de la descendance et étudier les variations du sex-ratio au cours du développement, non seulement chez les fourmis mais également chez tous les haplo-diploïdes, sociaux ou non sociaux.

J'illustre ensuite l'apport du FCM dans l'étude du contrôle du sex-ratio chez la fourmi *Plagiolepis pygmaea*, hôte potentiel du parasite social inquilin *P. xene*. L'évolution du parasitisme social, par lequel une espèce parasite manipule les ouvrières d'une espèce hôte afin que ces dernières élèvent le couvain parasite, est un des phénomènes les plus intrigants chez les Hyménoptères. Chez les fourmis, l'inquilinisme correspond à la forme la plus extrême de parasitisme social: les espèces inquilines ont perdu la caste ouvrière et ne produisent que des sexués qui sont élevés par les ouvrières de l'hôte. Une caractéristique propre aux espèces inquilines est la petite taille des sexués, laquelle est généralement similaire à celle des ouvrières de l'hôte (Bourke et Franks, 1991; Nonacs et Tobin, 1992). Cette *miniaturisation* du parasite aurait été favorisée afin de profiter du système de détermination des castes de l'espèce hôte, de telle sorte que le couvain du parasite se développe en sexués avec une quantité de nourriture équivalente à celle nécessaire pour élever les ouvrières de l'espèce hôte (Nonacs et Tobin, 1992). Une prédiction importante de l'hypothèse de la miniaturisation est que la réduction de taille des parasites pourrait limiter la capacité des ouvrières hôtes à distinguer entre le couvain sexué du parasite et son propre couvain ouvrière (Aron et al., 1999). En d'autres termes, la petite taille permettrait aux larves du parasite de passer « inaperçues » dans le couvain hôte, ce qui les protégerait d'une élimination par les ouvrières. Nous avons précédemment apporté 3 arguments en faveur de cette hypothèse (Aron et al., 1999). (1) Les sexués du parasite inquilin *P. xene* ont une taille inférieure ou égale à celle des ouvrières de l'hôte *P. pygmaea*. (2) La variance de la taille des sexués du parasite est significativement inférieure à celle des ouvrières et des sexués de l'hôte, indiquant l'existence d'une très forte sélection stabilisante sur la taille des parasites. (3) Enfin, nous avons également montré que les ouvrières de *P. pygmaea* élèvent les sexués du parasite *P. xene* jusqu'au stade adulte, alors qu'elles détruisent simultanément le couvain sexué (mâle) de leur propre espèce. Ces résultats nous ont conduit à soutenir que la miniaturisation des sexués du parasite lui permet en effet d'échapper au contrôle des ouvrières de *P. pygmaea* (Aron et al., 1999).

Cependant, la prédiction selon laquelle la petite taille des parasites leur permettrait d'échapper au contrôle des ouvrières hôtes peut être testée avec plus de précision en déterminant le stade de développement auquel les mâles de l'hôte sont éliminés par les ouvrières. Selon l'hypothèse de la miniaturisation, les ouvrières hôtes devraient éliminer toute larve dont la taille est supérieure aux plus grandes larves/cocons ouvrières de sa propre espèce. Afin de tester cette hypothèse, nous avons déterminé par cytométrie de flux les variations du sex-ratio au cours de différents stades larvaires chez *P. pygmaea*.

MATERIEL ET METHODES

Analyses en cytométrie de flux

Nous avons tenté de déterminer le degré de ploïdie d'adultes, de larves de différents stades (grandes, moyennes, petites, à l'éclosion), d'embryons (= œufs) et de sperme par la méthode de cytométrie de flux. Ces analyses ont été réalisées sur plusieurs espèces de fourmis, ainsi que sur des guêpes parasitoïdes. Les échantillons ont été analysés après coloration au P.I. sur un FACSCAN et un FACSCALIBUR (Beckton Dickinson).

Élimination du couvain mâle chez *P. pygmaea*

Afin de déterminer le stade larvaire auquel les mâles de *P. pygmaea* sont éliminés, le sex-ratio a été analysé à 3 stades de développement estimés sur la base de la taille des larves (Passera, 1969). Des petites larves glabres (< 0.55 mm, *i.e.* immédiatement à l'éclosion de l'œuf); des larves moyennes ($0.90 < x < 1.15$ mm) dont la taille est toujours inférieure à celle des plus grandes larves ouvrières; et des grandes larves (> 1.15 mm), dont la taille est

toujours supérieure à la taille maximale des larves/cocons ouvrières. L'analyse a porté sur 12 colonies expérimentales élevées en laboratoire, à raison de 15 larves/stade/colonie.

RESULTATS ET CONCLUSION

Analyses en cytométrie de flux

L'analyse en cytométrie de flux permet de distinguer entre échantillons haploïdes et diploïdes sans aucune ambiguïté et en quelques secondes seulement. Le degré de ploïdie peut être déterminé dès le premier stade larvaire. Le FCM ne permet toutefois pas de «sexer» les embryons (œufs). Ceci est vraisemblablement dû au trop petit nombre de cellules à ce stade de développement. Par ailleurs, dans toutes les analyses réalisées, le FCM produit des histogrammes dont le coefficient de variation est très faible. Ce qui permet de détecter de faibles fluctuations de quantité d'ADN nucléaire.

La cytométrie de flux s'avère donc extrêmement utile pour déterminer le sexe du couvain, en particulier chez les espèces où ce dernier ne peut être distingué sur la base (i) de caractères morphologiques externes, (ii) de sa position dans le nid, ou encore (iii) de la taille des cellules dans lesquelles il est élevé (cf. *Apis*).

Élimination du couvain mâle chez *P. pygmaea*

Au printemps (février/mars), les reines de *P. pygmaea* pondent $\pm 14\%$ d'œufs haploïdes (Aron et al., 1999). Cette proportion d'haploïdes s'observe également parmi les individus atteignant le premier stade larvaire. Cependant, plus aucune larve mâle n'est observée parmi les larves de taille moyenne et les larves de grande taille.

Nos résultats montrent donc que les mâles de *P. pygmaea* sont éliminés à un stade précoce de leur développement, bien avant d'atteindre la taille critique des plus grandes larves ouvrières. Contrairement à nos travaux antérieurs, ces résultats ne sont pas en accord avec l'hypothèse de la miniaturisation de Nonacs et Tobin (1992). Ils suggèrent que la reconnaissance du sexe du couvain - et l'élimination sélective du couvain mâle de sa propre espèce - par les ouvrières de *P. pygmaea* repose sur un mécanisme d'ordre chimique et/ou physique, inconnu, différent de la taille des larves ou des cocons. En outre, la reconnaissance précoce du sexe du couvain permet aux ouvrières de contrôler le sex-ratio en limitant les coûts associés à l'élimination du couvain mâle.

REFERENCES

- Aron S., Passera L., Keller L., 1999. Evolution of social parasitism in ants: size of sexuals sex ratio and mechanisms of caste determination. *Proc. R. Soc. Lond. Series B*, 266, 173-177.
- Aron S., Passera L., Keller L., 1994. Queen-worker conflict over sex ratio. A comparison of primary and secondary sex ratios in the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. *J. evol. Biol.*, 7, 403-418.
- Aron S., Vargo E.L., Passera L., 1995. Primary and secondary sex ratios in monogyne colonies of the fire ant. *Anim. Behav.*, 49, 749-757.
- Bourke A.F.G., Franks N.R., 1991. Alternative adaptations, sympatric speciation and the evolution of parasitic inquiline ants. *Biol. J. Linn. Soc.*, 43, 157-178.
- Bourke A.F.G., Franks N.R., 1995. *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press.
- Chapuisat M., Sundström L., Keller L., 1997. Sex-ratio regulation: the economics of fratricide in ants. *Proc R Soc Lond [Biol]*, 264, 1255-1260.
- Chapuisat M., Keller L., 1999. Testing kin selection with sex allocation data in eusocial Hymenoptera. *Heredity*, 82, 473-478.
- Charnov E.L., 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University Press, NJ.
- Charnov E.L., Los-den Hartogh R.L., Jones W.T., van den Assem J., 1981. Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature*, 289, 27-33.
- Crozier R.H., 1971. Heterozygosity and sex determination in haplo-diploidy. *Am. Nat.*, 105, 399-412.

- Crozier R.H., Pamilo P., 1996. *Evolution of Social Insect Colonies: Sex Allocation and Kin Selection*. Oxford University Press.
- Godfray H.C.J., 1994. *Parasitoids. Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.
- Godfray H.C.J., Werren J.H., 1996. Recent developments in sex ratio studies. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 59-63.
- Hardy I.C.W., 2002. *Sex Ratios. Concepts and research Methods*. Cambridge University Press.
- Keller L., Aron S., Passera L., 1996. Inter-nest sex-ratio variation and male brood survival in the ant *Pheidole pallidula*. *Behav. Ecol.*, 7, 292-298.
- Nonacs P., Carlin N.F., 1990. When can ants discriminate the sex of brood; a new aspect of queen-worker conflict. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 9670-9673.
- Nonacs P., Tobin J.E., 1992. Selfish larvae: development and the evolution of parasitic behavior in the Hymenoptera. *Evolution*, 46, 1605 - 1620.
- Passera L., Aron S., 1996. Early sex discrimination and male brood elimination by workers of the Argentine ant. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263, 1041-1046.
- Passera L., 1969. Biologie de la reproduction chez *Plagiolepis pygmaea* Latr. et ses deux parasites sociaux *Plagiolepis grassei* Le Masne et Passera et *Plagiolepis xene* Stärcke (Hymenoptera : Formicidae). *Ann. Sc. Nat. Zool. Paris*, 11, 327 - 482.
- Ross K.G., 1997. Multilocus evolution in fire ants – effects of selection, gene flow and recombination. *Genetics*, 145, 961-974.
- Smith R.H., Shaw M.R., 1980 Haplodiploid sex ratios and the mutation rate. *Nature*, 287, 728 - 729.
- Sundström L., Chapuisat M., Keller L. 1996 Conditional manipulation of sex ratios by ant workers: A test of kin selection theory. *Science*, 274, 993-995.
- Sundström L., Boomsma J.J., 2001. Conflicts and alliances in insect families. *Heredity*, 86, 515-521.
- Trivers R.L., Hare H., 1976. Haplodiploidy and the evolution of the social insects. *Science*, 191, 249 - 263.
- West S.A., Reece S.E., Sheldon B.C., 2002. Sex ratios. *Heredity*, 88, 117-124.
- West S.A., Sheldon B.C., 2002. Constraints in the evolution of sex ratio adjustment. *Science*, 295, 1685-1688.
- Wrensh D.L., Ebbert M.A., 1993. *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Chapman and Hall, New York.