

ÉCOLE DOCTORALE SST

IRBI UMR CNRS 6035

THÈSE

présentée par :

Denis LIMOUSIN

soutenue le : **07 Septembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

Sélection sexuelle chez un papillon acoustique : Etude évolutive du signal mâle et de la préférence femelle

THÈSE dirigée par :

M. GREENFIELD Michael

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

M. LENGAGNE Thierry

M. REINHOLD Klaus

Chargé de Recherche HDR, Université Claude Bernard Lyon 1

Professeur, Université de Bielefeld, Allemagne

JURY :

M. BUSSIÈRE Luc

M. GREENFIELD Michael

Mme HERNIOU Elisabeth

M. JALLON Jean-Marc

M. LENGAGNE Thierry

M. REINHOLD Klaus

Chercheur, Université de Stirling, Ecosse

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Chargé de Recherche HDR, Université François-Rabelais, Tours

Professeur Émérite, Université Paris-Sud 11, Orsay

Chargé de Recherche HDR, Université Claude Bernard Lyon 1

Professeur, Université de Bielefeld, Allemagne

A ma famille

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Michael D. Greenfield, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon doctorat au sein de son équipe. Je le remercie également pour la liberté de choix et la confiance qu'il m'a accordé ainsi que pour ses conseils précieux et sa disponibilité de tous les jours durant cette thèse.

Je remercie également M. Jérôme Casas et M. Jean-Paul Monge qui m'ont grand ouvert les portes de l'IRBI et je n'oublie pas aussi Me Anne-Geneviève Bagnères qui aura été la première à me donner ma chance et à me faire confiance dans le monde de la recherche.

J'adresse également mes sincères remerciements aux rapporteurs et aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci aussi à toute l'équipe « Physiologie et Ecologie Comportementale », qui m'a permis de m'épanouir pleinement au cours de cette thèse. Je n'oublierai pas toutes les discussions scientifiques ou non avec les différents membres de l'équipe.

Je tiens aussi à remercier les différentes personnes qui ont participé à mes différents projets : Laura Burratti et Virginie Dupuy.

De plus, je suis très reconnaissant envers les différents organismes qui m'ont financé, c'est-à-dire le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur et l'université de Tours, sans qui je n'aurais pu réaliser cette thèse.

Par ailleurs, je n'aurais pu réaliser cette recherche sans l'accueil chaleureux de Réjane Streiff au sein du Centre de Biologie pour la Gestion des Populations à Montpellier. Merci pour son soutien constant dans mon projet de génotypage et pour sa bonne humeur communicative. Un grand merci également à tous les membres de ce beau laboratoire pour leur accueil et leur aide au cours de mes différents séjours sous le soleil de Montpellier. De même, un grand merci à Me Brigitte Courtois pour m'avoir transmis ses connaissances concernant les analyses des QTL et pour son aide et sa disponibilité permanente.

Cette thèse n'aurait pas pu se réaliser sans l'aide scientifique, technique et administrative de nombreuses personnes de l'IRBI. Je commencerai tout d'abord par remercier Guy Bourdais et Fabrice Vannier pour les longs moments passés ensemble pour l'élevage de notre papillon fétiche. Je n'oublie pas aussi Bruno Brizard, Karine Musset et Simon Dupont pour leur aide technique à différents moments de ma thèse. Je remercie également Martine Ouahi pour nos discussions matinales. Enfin, sans le « pôle administratif » je n'aurais pas pu faire grand-

chose ; donc merci à Sonia Djaoui, Christine Besse, Dominique Lidoreau, Hélène Joly, Nadine Busson et Maryse Georget.

Je tiens également à remercier Dominique Pierre, Sébastien Moreau et Marlène Goubault pour leur aide et leurs conseils précieux qui m'ont permis de m'épanouir au mieux dans le rôle d'enseignant, au cours de cette thèse.

Je n'oublierai évidemment pas Odette Brunel, Sylvain Alem, Séverine Ligout ainsi que toutes les personnes qui ont partagé un jour ou l'autre notre bureau, pour leur attention et les bons moments passés ensemble.

Egalement, sans pouvoir les citer un par un, je tiens à remercier tous les membres de l'IRBI pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'agréables conditions ainsi que toutes les personnes qui ont contribué à cette thèse et que j'aurais pu oublier.

De plus, comment ne pas oublier les bonnes soirées foot en milieu de semaine avec Jérémy, Julien, Germain, Sylvain et Thomas en rêvant aux futurs exploits d'un club en Rouge et Noir. Je n'oublie pas aussi tout mes retours au bercail, où j'ai pu décompresser en famille et avec mes amis. Ainsi, malgré mon absence la semaine, je remercie mes amis footballeurs de m'avoir permis de passer de si bons dimanches à gambader sur les terrains verts, me permettant ainsi de garder une forme d'athlète pour mener à bien cette thèse. De plus, comment ne pas parler de mes amis musiciens. Que ce soit à l'harmonie de Suèvres/Mer ou chez les Zik'autain, j'ai toujours pu me vider la tête en jouant des morceaux jusqu'au bout de la nuit tout en n'échappant pas à la fameuse question : Mais au fait, tu fais quoi avec tes papillons ? Je ne pourrai pas tous les citer mais je remercie Valou, Delphine, David, Angé, Thierry, Olivier, Bruno, Karen, Myriam, Marie, Lucie,.... Que de bons moments passés ensemble.

Enfin, toute cette thèse n'aurait pu se faire sans l'aide indispensable de mes parents. Que ce soit sur le plan matériel ou moral, ils ont toujours cru en moi et ont toujours suivi mes choix. Aussi, je les remercie pour leur patience et pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Je n'oublie pas également toute ma famille qui est essentielle pour moi ainsi que mes amis. Je ne pourrai pas tous les citer, mais je pense en premier lieu à mon frère jumeau: Vincent et aussi à tous les autres : Estelle mon amie, Adeline, Julie, Baptiste, Esteban, Hélène, Julie...

Résumé

Théorie et études empiriques indiquent que les différents aspects de la sélection sexuelle peuvent être des facteurs importants dans l'évolution des traits morphologiques et comportementaux chez de nombreuses espèces animales. La sélection intersexuelle, le choix d'un partenaire du sexe opposé, peut favoriser l'évolution de traits mâles extravagants préférés par les femelles, même lorsque ces traits ne confèrent aucun avantage dans le contexte de la sélection naturelle ; c'est-à-dire une meilleure survie. Ainsi, une femelle qui choisit un mâle portant de tels traits va en bénéficier, en donnant naissance à une progéniture mâle qui héritera du trait et qui sera donc plus attrayante à son tour. J'ai étudié ce processus de sélection intersexuelle chez une pyrale acoustique, *Achroia grisella*, une espèce chez laquelle les mâles attirent les femelles avec un chant d'avertissement ultrasonique. De précédentes recherches ont montré que les femelles évaluaient des partenaires potentiels en se basant sur certains paramètres acoustiques de leurs chants, et qu'elles ne recevaient aucun « bénéfices directs », comme par exemple des soins parentaux ou des ressources via un spermatophore, en raison d'un accouplement avec un mâle particulier. De plus, certains de ces paramètres acoustiques du chant mâle ainsi que les comportements avec lesquels les femelles discriminent les différents mâles semblent être des traits héréditaires. Ces facteurs suggèrent qu'un mécanisme de bénéfices indirects (génétiques), lors du choix du partenaire (mécanisme de Fisher), est présent chez *A. grisella*. Au cours de cette thèse, j'ai poursuivi l'étude de ce mécanisme de choix du partenaire à deux niveaux. Tout d'abord, j'ai effectué une analyse détaillée du comportement de choix des femelles pour comprendre précisément, la façon avec laquelle, elles évaluent un paramètre critique du chant mâle, qu'est l'amplitude. Deuxièmement, j'ai analysé la covariance génétique entre les traits du chant mâle et ceux de la préférence femelle au niveau moléculaire. Une telle covariance est attendue, car la théorie explique que c'est un élément clé soutenant le mécanisme de bénéfices indirects du choix du partenaire. Dans la première partie, j'ai constaté qu'en plus d'évaluer l'amplitude globale et la puissance acoustique du chant mâle, les femelles accordent une attention particulière aux « pics d'amplitude » qui peuvent se produire lorsqu'un chant est diffusé, et elles préfèrent les chants qui présentent de tels pics. Cependant, malgré cette préférence, une variété de « types de chant », ceux qui comprennent des pics d'amplitude et ceux qui n'en comprennent pas, est observée chez les mâles dans les populations naturelles. Dans la deuxième partie, j'ai développé une carte de liaison génétique en utilisant des marqueurs AFLP et j'ai ensuite

déecté et cartographié des QTLs qui influencent les traits du chant mâle et ceux de la préférence femelle. J'ai trouvé des QTLs qui exercent une influence modérée sur plusieurs traits du chant et de la préférence, et un QTL qui semble exercer une influence majeure sur un trait critique du chant mâle, le rythme avec lequel les paires de pulses sont délivrés. Mais malgré ces constatations, je n'ai pas observé de colocalisation de traits du chant et de la préférence sur le même groupe de liaison (= chromosome putatif). Ainsi, je n'ai trouvé aucune preuve moléculaire concernant la liaison physique de ces différents traits. Cette observation, combinée à une étude parallèle qui avait échoué à mettre en évidence un déséquilibre de liaison entre les traits du chant mâle et ceux de la préférence femelle due à un accouplement non aléatoire, suggère que la covariance génétique entre chant et préférence n'est pas significative chez *A. grisella*. Une analyse récente de la littérature indique qu'une covariance génétique insignifiante est peut être plus souvent la norme qu'une exception chez les espèces animales, ce qui implique que le mécanisme de bénéfices indirects du choix du partenaire peut généralement fonctionner à un tempo réduit ou modéré.

Mots-clés: *Achroia grisella*, sélection sexuelle, signal ultrasonique mâle, préférence femelle, puissance acoustique, évolution du signal, corrélation génétique, QTL

Abstract

Theory and empirical studies indicate that the various aspects of sexual selection can be significant factors in the evolution of morphological and behavioral traits in many animal species. Inter-sexual selection, the choice of a partner of the opposite sex, may favor the evolution of extravagant male traits preferred by females even when these traits confer no advantage in the context of natural selection; i.e. enhanced survival. Rather, a female who chooses a male bearing such traits may benefit by giving birth to male offspring who inherit the trait and are therefore attractive in turn. I studied this process of inter-sexual selection in an acoustic pyralid moth, *Achroia grisella*, a species in which males attract females with an ultrasonic advertisement song. Previous research has shown that females evaluate potential mates based on certain acoustic parameters of their song, and that they do not receive any 'direct benefits', e.g. parental care, spermatophore resources, by virtue of mating with a particular male. Moreover, certain of these acoustic parameters of the male song as well as the behavior by which females discriminate among males appear to be heritable traits. These factors suggest that an indirect (genetic) benefits mechanism (Fisherian mechanism) of mate choice operates in *A. grisella*. In this thesis I continued the study of this mechanism of mate choice at two levels: First, I conducted a detailed analysis of female choice behavior to understand the precise way in which they evaluated a critical parameter of male song, sound amplitude. Second, I analyzed the genetic covariance between male song and female preference traits at a molecular level. Such covariance is expected, as theory explains that it is a key feature sustaining the indirect benefits mechanism of mate choice. In the first part I found that in addition to evaluating overall amplitude and acoustic power of male song, females pay particular attention to 'amplitude peaks' that may occur when song is broadcast, and they prefer songs that display such peaks. Despite this preference, however, a variety of 'song types', those that include amplitude peaks and those that do not, are observed among males in natural populations. In the second part I developed a linkage map using AFLP markers and then detected and mapped QTL that influence male song and female preference traits. I found QTL that exert moderate influences on the several song and preference traits, and one QTL that appears to exert a major influence on one critical male song trait, the rhythm at which pulse pairs are delivered. But despite these findings, I did not observe any colocalization of song and preference traits on the same linkage group (= putative chromosome). Thus, I found no molecular evidence for physical linkage of these different

traits. This observation, combined with a parallel study that had failed to find evidence for linkage disequilibrium between male song and female preference traits due to non-random mating, suggests that song/preference genetic covariance is not significant in *A. grisella*. A recent survey of the literature indicates that insignificant genetic covariance may be more the norm than the exception among animal species, implying that the indirect benefits mechanism of mate choice may typically operate at a reduced or moderate tempo.

Key words: *Achroia grisella*, sexual selection, ultrasonic male signaling, female preference, acoustic power, signal evolution, genetic correlation, QTL

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé.....	5
Abstract	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
 INTRODUCTION GENERALE.....	 16
I - Généralités.....	17
1. 1 Sélection sexuelle.....	17
1. 2 Systèmes d'appariements et stratégies de reproduction.....	20
II - Modèles actuels de la sélection sexuelle.....	23
2. 1 La théorie de Fisher.....	24
2. 2 La théorie des bons gènes.....	25
2. 3 Les bénéfices directs.....	26
2. 4 Reproduction dans le cadre d'un lek.....	27
2. 5 Paradoxe du lek.....	29
III - Les signaux animaux.....	31
3. 1 Signaux d'annonce vs signaux de cour.....	32
3. 1. 1 Les signaux d'annonce.....	32
3. 1. 2 Les signaux de cour.....	33
3. 2 Rôle des signaux dans le choix du partenaire sexuel.....	34
3. 3 Caractéristiques des signaux acoustiques.....	37
3. 3. 1 Tests de préférences acoustiques.....	37
3. 3. 2 Paramètres analysés du signal.....	38
3. 3. 3 Fiabilité du signal.....	39
3. 4 Mécanismes permettant de conserver une variance génétique.....	40
IV - <i>Achroia grisella</i> , un papillon acoustique particulier.....	42

CHAPITRE 1 : Evaluation du chant mâle : les femelles répondent aux notes fortissimo.....	46
Evaluation of amplitude in male song: female waxmoths respond to fortissimo notes.....	49
Abstract.....	50
Introduction.....	50
Materials and Methods.....	53
Results.....	63
Discussion.....	69
 CHAPITRE 2: Architecture génétique de la préférence femelle et du chant mâle chez un papillon acoustique.....	74
The genetic architecture of female preference and male song in an acoustic moth.....	77
Abstract.....	78
Introduction.....	79
Materials and Methods.....	83
Results.....	92
Discussion.....	101
Appendix 1.....	106
 DISCUSSION GENERALE.....	118
I - Importance des signaux.....	120
II - Signaux vs Préférences.....	124
III - Conclusion.....	127
 BIBLIOGRAPHIE.....	131

Liste des tableaux

Tableau 1: Spearman rank correlations between parameters of amplitude fluctuation (rows 1–4) and parameters of temporal and song energy (columns 1–5) as determined from measurements of 82 males.....	67
Tableau 2: Trait codes, full names and their units.....	85
Tableau 3: List of primers used for the AFLP genotyping protocol with the number of informative markers per brood. e = EcoRI (5' -GACTGCGTACCAATTC- 3') and m = Mse (5' -GATGAGTCCTGAGTAA- 3').....	89
Tableau 4: Main effect QTLs determined via CIM mapping in Xt7 (a) and Xt19 (b), with additive (= the estimated additive effect) and R^2 (= the percentage of the variance explained by the QTL) shown in the two columns at the right.....	100

Liste des figures

Figure 1: Tétras des armoises (*Centrocerus urophasianus*) sur un lek.....28

Figure 2: Mâle (gauche) et femelle (droite) de la petite fausse teigne, *Achroia grisella*.....42

Figure 3: Oscillogram of four consecutive pulse-pair periods of the standard male signal used for testing female preference. The standard signal represents average temporal and energy values measured in the population; these values include: short pulse-pair period=10.4 ms; long pulse-pair period=14.6 ms; long asynchrony interval ($AI_1=554\ \mu s$); short asynchrony interval ($AI_2=530\ \mu s$); peak amplitude of pulse 1=1.00 arbitrary linear units; peak amplitude of pulse 2=1.23; peak amplitude of pulse 3=1.17; peak amplitude of pulse 4=1.09. The four numbered pulses comprise two consecutive pulse pairs or two consecutive pulse-pair periods, which are repeated for the duration of a playback trial. All call models are generated from a single pulse; vertical displacements from the baseline on the oscillogram accurately reflect maximum and minimum amplitude values of a pulse and are not subject to aliasing or pixelization, which could bias the oscillogram toward depicting lower values.....55

Figure 4: Oscillograms showing standard and modified signals presented in the four playback experiments. In each experiment the amplitude of the second, most intense pulse (2) of the standard signal (see **Figure 3**) is adjusted to 75 dB peSPL at the position of the tested female; the modified signal is created by adjusting the standard signal by specific decrements and increments in amplitude. (A) Experiment testing amplitude discrimination: modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitudes of each pulse are decremented by 6 dB, i.e. the second, most intense pulse is broadcast at 69 dB peSPL. (B) Experiment testing discrimination between fluctuating and standard song: the modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitudes of the pulses in the first half of the 8-period modification cycle are each decremented by 6 dB (50%) whereas the pulses in the second half of the modification cycle are each incremented by 6 dB (100%); i.e. the second (2) and tenth (10) pulses of the modified signal are broadcast at 69 and 81 dB peSPL, respectively. (C) Experiment testing discrimination between fluctuating and standard song: the modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitudes of the pulses in the first half of the

8-period modification cycle are each decremented by 50% (6 dB) whereas the pulses in the second half of the modification cycle are each incremented by 50% (3.5 dB), thereby preserving the same power as broadcast in the standard signal; i.e. the second (2) and tenth (10) pulses of the modified signal are broadcast at 69 and 78.5 dB peSPL, respectively. (D) Experiment testing discrimination between fluctuating and standard song at shorter time scales: modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitude of the first of four pulses is decremented by 75% and the following three are incremented by 25%, thereby preserving the same power as broadcast in the standard signal. Vertical displacements from the baseline accurately depict maximum and minimum amplitude values of a pulse; see **Figure 3**.....58

Figure 5: Female discrimination between standard and modified signals presented in the four playback experiments. In each experiment the dark, medium, and light vertical bars represent the numbers of females orienting toward the loudspeaker broadcasting the modified signal, the standard signal, or failing to orient to either loudspeaker, respectively. (A) Experiment testing amplitude discrimination between the standard signal (75 dB peSPL) and the modified signal (peak amplitude of second, most intense pulse is indicated along x-axis). (B) Experiment testing discrimination between standard and fluctuating song (magnitude and modification cycle of fluctuation indicated along x-axis). (C) Experiment testing discrimination between standard and fluctuating song where power is conserved in both songs (magnitude and modification cycle of fluctuation indicated along x-axis). (D) Experiment testing discrimination between standard and fluctuating song at shorter time scales (amplitude decrement or increment of first pulse in fluctuating song is indicated along x-axis; the following three pulses were incremented or decremented accordingly to conserve the power broadcast in the standard song; see text). * $P < 0.05$, two-tailed binomial test; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; underlined asterisks indicate $P < 0.05$ following Holm correction for multiple tests (Holm, 1979). Within each of the four experiments, modified signals with the same letters above the vertical bars do not have significantly different levels of discrimination; $P > 0.05$, McNemar's test for comparison of dependent proportions (Zar, 1999). In A and D, an individual female was tested with all four modified signals and the control. In B and C, an individual female was tested with either modified signals 1, 2, 5 and 6 and control 1 (five tests) or with modified signals 3 and 4 and control 2 (three tests).....61

Figure 6: Oscillograms showing two representative males singing (A) with marked amplitude fluctuations between successive pulse pairs and (B) at relatively constant amplitude. In both A and B, each apparent pulse actually represents a pulse pair (see Figure 3). Vertical displacements from the baseline accurately depict maximum and minimum amplitude values of a pulse pair; see Figure 3	64
Figure 7: Indices of amplitude fluctuation observed among 82 males sampled from the laboratory population. (A) Coefficient of variation of peak amplitude of pulse pairs (parameter 6). (B) Coefficient of variation of root mean squares (r.m.s.) amplitude of pulse pairs (parameter 7). (C) Standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of pulse pairs (parameter 8). (D) Standardized difference between maximum and minimum r.m.s. amplitude of pulse pairs (parameter 9). See text for definitions of parameters. +, value of index in standard signal; X, value of index in ± 3 dB modified signal; ●, value of index in ± 6 dB modified signal.....	66
Figure 8: (A) Coefficient of variation of peak amplitude of pulse pairs versus mean peak amplitude of pulse pairs. (B) Coefficient of variation of root mean squares (r.m.s.) amplitude of pulse pairs versus mean r.m.s. amplitude of pulse pairs. (C) Standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of pulse pairs (see text) versus mean peak amplitude of pulse pairs. (D) Standardized difference between maximum and minimum r.m.s. amplitude of pulse pairs versus mean r.m.s. amplitude of pulse pairs. Data points represent 82 males sampled from the laboratory population. See Tableau 1 for correlation statistics.....	68
Figure 9: Phenotypic variation of developmental and sexual traits observed in both broods sampled for genotype analysis. In each graph, the dark and light vertical bars represent brood Xt7 and brood Xt19, respectively. (A) Female body mass. (B) Male body mass. (C) Developmental time of tested individuals (D) Pulse-pair rate of male song. (E) Mean peak amplitude of male song. (F) Mean asynchrony interval duration of male song. (G) Female preference index. (H) Duration of female trajectory from release point to arrival at one of 2 stimuli (broadcasting loudspeakers).....	96

Figure 10: QTL map for developmental and sexual traits. Linkage groups with QTL are represented ; where applicable, linkage groups from the two broods are shown. The red line indicates the position of the QTL, and its thickness is proportional to the LOD value. Linkage group identities (brood ; linkage group number) are indicated above each graph, and names of QTL traits are shown next to the red line. Map distances are in cM, estimated by the Kosambi mapping function.....98

Appendix 1: QTL map for developmental and sexual traits. All linkage groups are represented, and the blue dotted lines are the connector lines between common markers in Xt7 and Xt19. The black triangle indicates the position of the QTL ; its size, the LOD value and its orientation, the estimated additive effect. The black line indicates the confidence interval of the respective QTL. Linkage group identities (brood ; linkage group number) are indicated above each graph, and names of QTL traits are shown above the black line. Map distances are in cM, estimated by the Kosambi mapping function.....106

INTRODUCTION GENERALE

I - GENERALITES

1. 1 Sélection sexuelle

En 1859, Darwin dans son texte fondateur « On the origin of species », proposa le concept de sélection sexuelle, en complément de la théorie de la sélection naturelle.

Sexual selection... depends, not on a struggle for existence, but on a struggle between the males for possession of the females; the result is not death to the unsuccessful competitor, but few or no offspring. (Darwin, 1859, p.88)

En effet, suite à la définition de la sélection naturelle qui est basée sur la reproduction différentielle des individus en fonction de leur capacité de survie, Darwin devait faire face à un problème majeur : il observa que certaines espèces déployaient des caractères exagérés et défavorables du point de vue de la sélection naturelle. La question était alors la suivante : pourquoi ces caractères, qui réduisent en apparence l'aptitude à survivre et à se reproduire, n'ont-ils pas été éliminés par la sélection naturelle? Le problème était crucial, car de tels caractères semblaient contredire le mécanisme adaptatif découvert par Darwin. Ainsi, l'utilisation du concept de sélection sexuelle va permettre d'expliquer l'existence de ces caractères coûteux ou simplement inutiles présents chez les mâles et qui réduisent leur probabilité de survie comme les cornes des cervidés, les couleurs vives du plumage de certains oiseaux ou bien encore le chant des cigales.

Ce concept, qui sera approfondi plus tard dans « La descendance de l'homme et la sélection naturelle » (*La filiation de l'homme et la sélection liée au sexe*, dans la nouvelle traduction de M. Prum ; « The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex »), publié en 1871, a donc l'avantage d'expliquer pourquoi certains attributs ou comportements représentent des handicaps au regard de la survie et peut éclairer aussi sur l'origine du dimorphisme sexuel ou bien encore l'émergence de nouvelles espèces (phénomène de spéciation).

La sélection va donc s'expliquer ici par le fait que les mâles dotés d'attributs sexuels « ornements » attirent davantage les femelles et augmentent de ce fait leur aptitude à se reproduire. Selon la définition donnée par Darwin au chapitre VIII de son livre « *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex* », la sélection sexuelle dépend « de l'avantage que possèdent certains individus sur d'autres de même sexe et de même espèce, uniquement en ce qui concerne la reproduction ». Les espèces vont donc déployer des caractères secondaires (Darwin parle de « caractères sexuels secondaires », à la suite de Hunter), (Hunter, 1837), dans la compétition entre individus pour la reproduction sexuée. Ils sont appelés caractères secondaires car ils ne jouent pas un rôle direct et nécessaire dans le processus de reproduction, par opposition aux caractères sexuels primaires, qui quant à eux sont procréatifs tels que les organes génitaux par exemple.

Ainsi, la sélection sexuelle est celle des caractères qui accroissent les chances de succès sexuel.

On va pouvoir distinguer 2 grandes modalités dans cette sélection sexuelle :

- une compétition entre les individus du même sexe (le plus souvent les mâles) pour tout simplement avoir une plus grande opportunité de se reproduire avec le sexe opposé. En effet, on observe souvent des affrontements physiques où les mâles essayent d'intimider leurs congénères par la force. Le mâle gagnant sera donc identifié comme le plus fort, le plus apte. La femelle de part son choix envers ce mâle obtiendra des bénéfices et on parle ici de sélection intra-sexuelle.

- une compétition afin d'être le plus attirant pour les membres du sexe opposé, ce qui conduit le plus souvent à une sélection directe par la femelle des mâles avec lesquels elle choisit de s'accoupler. Les mâles vont donc avoir tendance à déployer toutes sortes d'atouts et d'attributs afin de se faire remarquer et être choisis par les femelles. Le mâle va ainsi adopter une véritable stratégie de séduction vis-à-vis de la femelle qui doit effectuer un choix de la paternité. On parle alors de sélection intersexuelle.

Par ailleurs, le simple fait que le choix du partenaire repose essentiellement, et dans la plupart des cas, sur l'un des deux sexes (mâle ou femelle selon l'espèce considérée) induit nécessairement l'existence d'une sélection sexuelle. Cette sélection vient du fait que l'accès à

l'un des deux sexes pour la reproduction est une ressource limitante pour l'autre sexe. Dans ce cas, une partie des individus du sexe ainsi limité n'aura pas accès à la reproduction, ce qui génère une sélection, engendrant une compétition entre les individus du sexe limité, et permettant aux membres du sexe limitant d'effectuer un choix. En regardant de plus près, cette sélection sexuelle, on constate le plus souvent, que les femelles choisissent alors que les mâles sont en compétition entre eux, ce qui amène à une asymétrie au niveau de cette sélection sexuelle.

Ainsi, la sélection sexuelle est exercée le plus souvent par les femelles, ce qui peut s'expliquer tout d'abord par un plus fort investissement en énergie nécessaire à la production de ses gamètes. En effet, les femelles produisent un petit nombre de gamètes, de plus grande taille comparé à ceux des mâles, qui eux produisent un très grand nombre de gamètes mais d'une taille moindre.

Cette théorie où les femelles investissent presque toujours plus d'énergie que les mâles dans la production de descendants est appelé le principe de Bateman (1948). Les observations de Bateman proviennent de travaux empiriques sur le comportement reproducteur des drosophiles. Il a ainsi attribué l'origine de cet investissement inégal à la différence de production des gamètes : le sperme étant moins coûteux que les œufs. Les animaux sont par conséquent fondamentalement polygyne en raison de cette anisogamie. Dans l'ensemble, le succès reproducteur d'un mâle augmente avec le nombre de femelles auxquels il s'accouple, alors que le succès reproducteur d'une femelle n'augmente pas, même en s'accouplant avec plusieurs mâles. Cela se traduit par la sélection sexuelle, dans laquelle les mâles combattent les uns avec les autres, et les femelles deviennent exigeantes dans le choix du mâle pour s'accoupler.

Par ailleurs, en se basant sur les études empiriques de Bateman (1948) sur la drosophile, Trivers (1972) décrit l'origine de cette sélection sexuelle en expliquant la répartition des rôles sexuels et affirme que le sexe qui s'investit le plus dans la reproduction au travers, par exemple de la production des gamètes et dans les soins prodigués envers la progéniture tel que l'allaitement, la protection contre les prédateurs ou bien encore le nourrissage, est le sexe qui, lors de l'accouplement, sera le plus difficile dans le choix et exercera une plus grande pression de sélection sexuelle sur le sexe opposé. On parle alors d'investissement parental et c'est ce qui représente l'ensemble des investissements (énergie, temps, etc.) qu'un parent fait pour un de ses descendants et qui en augmente la chance de

survie. Toutefois, cela enlève à ce parent des possibilités pour investir dans une autre progéniture ou dans d'autres composants de sa valeur sélective associés à sa survie tels que la recherche de nourriture.

La théorie de l'investissement parental prédit ainsi que si la femelle s'investit plus que le mâle, les rôles sexuels seront alors conventionnels (les mâles se battent pour l'accouplement et les femelles choisissent). À l'inverse, le sexe qui s'investit le moins dans les soins parentaux doit avoir par conséquent un investissement sexuel plus important et fera face à une concurrence plus grande pour trouver un partenaire, tout en veillant à se reproduire le plus possible afin d'assurer son succès reproducteur.

Du fait de l'anisogamie, les femelles investissent au départ plus dans la production des gamètes que les mâles, ce qui explique (selon cette théorie) que les rôles sexuels soient plus souvent conventionnels et que l'investissement parental des femelles soit plus important.

La femelle va donc choisir un mâle en fonction de certains traits (taille du corps, couleur, dominance, etc.) sensés lui garantir un meilleur succès reproducteur et va donc exercer une sélection sexuelle en ce sens (Moller and Thornhill, 1998). Finalement, dans la plupart des espèces, les femelles représentent une ressource limitante pour laquelle l'autre sexe sera en compétition.

1. 2 Systèmes d'appariements et stratégies de reproduction

La sélection sexuelle est donc souvent plus forte chez les mâles que chez les femelles. Mais quelles sont les raisons qui amènent à des différences dans la force de cette sélection sexuelle. Parmi celles-ci, on constate que les systèmes de reproduction représentent un des facteurs primordial influençant la force et les conséquences de la sélection sexuelle.

En effet, les espèces vont adopter différents comportements afin de se reproduire et d'assurer leur continuité via leur descendance. Ainsi, depuis longtemps, un grand nombre de systèmes de reproduction ont été identifiés en biologie évolutive, mais il n'existe pas encore une classification reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique.

Tout d'abord, le nombre de partenaires reproducteurs par mâle et par femelle est l'un des principal critères, mais le sens exact des termes comme monogamie, polygynie et

polyandrie varie selon les différentes études auxquelles on s'intéresse. En se focalisant sur une étude concernant les insectes, Thornhill et Alcock ont utilisé la classification suivante pour les différents termes :

- monogamie : chaque individu a un seul partenaire sexuel
- polygamie : chaque individu a plusieurs partenaires sexuels et cette stratégie reproductrice se décompose en 2 groupes :
 - polyandrie : certaines femelles s'accouplent avec plus d'un seul mâle
 - polygynie : certains mâles s'accouplent avec plus d'une seule femelle par saison de reproduction.

Enfin chez certains animaux, le système de reproduction peut être mieux défini en utilisant le terme de polygynandrie (ou promiscuité), dans le cas où aussi bien les mâles que les femelles ont plusieurs partenaires reproducteurs par saison.

Lorsqu'on regarde les études menées sur le thème de la sélection sexuelle, on constate qu'elles se focalisent principalement sur la polygynie dont on distingue le plus souvent 2 formes majeures.

D'un côté, on parle tout d'abord de polygynie avec protection des ressources, lorsqu'un mâle défend et contrôle des ressources, comme la nourriture ou un site de nidification, pour attirer plus d'une femelle (Emlen and Oring, 1977). Ainsi, une femelle, lorsqu'il y a des différences de qualité entre les territoires de plusieurs mâles, pourra choisir celui dont le territoire présentera les caractéristiques répondant au mieux à ses critères de sélection, même s'il s'agit d'un mâle déjà accouplé.

De l'autre côté, on parle de polygynie à lek, lorsque les mâles ne fournissent pas de ressources matérielles mais seulement des gènes. Dans ce cas précis, les mâles s'agrègent sur des arènes pour parader. Ils défendent chacun un petit territoire, que les femelles visiteront ensuite afin de choisir leur partenaire, comme cela peut-être le cas chez les tétras lyre, *tetrao tetrix* (Rintamäki et al., 1995). Ainsi, des mâles de « meilleures qualités » auront la possibilité de s'accoupler un grand nombre de fois. Ce type de parade nuptiale, se rencontre

principalement chez les oiseaux, les insectes, ou encore les grenouilles (Wells, 1977a; Thornhill and Alcock, 1983; Bradbury, 1985).

Finalement, différents systèmes de reproduction sont adoptés selon les espèces afin de permettre la rencontre entre gamètes mâles et femelles garantissant ainsi le succès de ces reproductions sexués.

Nous allons donc voir à présent les différents modèles qui expliquent aujourd'hui l'existence de plusieurs stratégies afin de choisir le partenaire adéquat.

II - MODELES ACTUELS DE LA SELECTION SEXUELLE

Lors du choix de partenaire, si le sexe limitant a accès à plusieurs membres du sexe opposé, il aura alors la possibilité de choisir. De plus, comme ce sexe limitant a le plus fort investissement gamétique, il est plus susceptible de se préoccuper de la qualité du partenaire et d'être exigeant durant la parade. La qualité du partenaire peut être appréciée sous l'angle de différents éléments selon les espèces, comme par exemple la taille, l'état physiologique, les capacités d'approvisionnement, les compétences parentales, l'agilité, l'intelligence, l'âge, la viabilité, la résistance aux parasites ou bien encore la complémentarité génétique. Le sexe qui choisira utilisera alors une combinaison d'informations provenant de connaissances préalables, d'observations du signaleur et d'analyses des signaux émis par ce signaleur afin de prendre sa décision. Le signal ayant en effet la possibilité de coder des informations concernant la qualité du signaleur, le problème de l'honnêteté du signal se pose alors. Nous allons donc voir comment les mécanismes de choix du partenaire vont déterminer l'honnêteté des signaux de parade.

Ainsi, lorsque les femelles sont libres dans le choix, pourquoi ces dernières sont-elles si exigeantes quand il s'agit de l'accouplement ? Cette question laisse perplexe les évolutionnistes et les comportementalistes depuis des décennies. En général, elles tentent de sélectionner les mâles pouvant améliorer au maximum leur fitness. Dans les systèmes de reproduction où les mâles offrent des bénéfices directs pour la femelle ou ses descendants, comme un abri ou de la nourriture, la réponse semble simple : les femelles doivent préférer s'accoupler avec des mâles qui sont en mesure de fournir le plus de ressources. La réponse est moins claire dans les autres systèmes de reproduction où les mâles ne donnent aucune ressource aux femelles. Ainsi, les modèles théoriques qui tiennent compte de l'évolution du choix du partenaire dans des systèmes de reproduction sans ressource, nécessitent que les femelles en raison de leur choix, obtiennent un avantage génétique par une augmentation de la fitness de leurs descendants. Différents modèles vont alors tenter d'expliquer l'évolution des phénomènes qui ont lieu lors du choix du partenaire (Kokko et al., 2003).

Une forte préférence femelle va donc conduire à l'élaboration de caractères mâles permettant d'attirer les femelles. Cette préférence des femelles pour des traits sexuels mâles élaborés, est aussi présente chez des espèces où les mâles donnent seulement leurs gènes à la génération future. Dans de tel système, le choix du partenaire semble être bénéfique pour les femelles d'un point de vue génétique. Pour que ces bénéfices génétiques soient possibles, il doit y avoir de la variance génétique additive (V_a) pour les ornements sexuels, afin que des mâles, ayant de grands ornements, puissent transmettre leurs gènes à la progéniture des femelles qui les ont choisis. En effet, cette variance qui peut être héréditaire représente la partie de la variance phénotypique qui est due aux effets additifs de tous les allèles en tous les loci. Par conséquent, si les mâles sont tous les mêmes, il n'y a pas de variance génétique additive et le choix des femelles va tendre à disparaître. En prenant le temps de choisir, la femelle doit donc recevoir un bénéfice génétique. Nous verrons par la suite que différents mécanismes vont permettre d'expliquer le maintien de cette variation des ornements sexuels (Radwan, 2008).

Trois grands modèles de base ont donc été proposés pour expliquer la présence de signaux permettant l'attraction lors de l'accouplement : le processus de Fisher et la théorie des bons gènes pour les bénéfices indirects, et les bénéfices directs. Ici, les femelles sont supposées être le sexe exigeant et les mâles, le sexe compétiteur qui émet des signaux. Dans tous les cas, on va observer une évolution simultanée de la préférence femelle pour un trait spécifique mâle et une évolution de ce trait. Ces 3 modèles vont différer de par leurs hypothèses, leurs mécanismes et de l'honnêteté des traits attractifs résultant.

2. 1 La théorie de Fisher

Décrite en 1930, par Ronald Aylmer Fisher dans son livre intitulé « The Genetical Theory of Natural Selection », cette théorie permet d'expliquer la présence de traits différents entre les individus, en raison d'un emballement évolutif. Tout d'abord, pour que ce processus ait lieu, il doit exister une certaine variabilité génétique associée à une variabilité phénotypique pour un trait mâle donné, tel qu'une tâche de couleur vive ou une queue très longue, et une certaine variabilité génétique concernant la tendance de la femelle à préférer des mâles ayant cette caractéristique phénotypique. Ainsi, les mâles avec ce trait préféré obtiendront plus d'accouplement, et comme leurs partenaires seront le plus souvent des

femelles avec cette préférence, les gènes codant pour la préférence femelle et le caractère mâle seront transmis préférentiellement par l'intermédiaire de leur progéniture. Par ailleurs, les femelles avec cette préférence auront elles aussi, un avantage, parce que leurs fils posséderont ce trait préféré et auront donc par conséquent plus de succès et ainsi ces femelles auront donc plus de descendants. L'évolution du trait mâle (tâche de couleur vive, longueur de la queue,...) et l'évolution du choix des femelles vont alors se renforcer l'un et l'autre, en un processus que Fisher a appelé un emballement évolutif. Ainsi, l'évolution d'un caractère précis (en termes de fitness) peut atteindre un optimum, puis, en raison de l'emballement, il peut dépasser cet optimum. Ce caractère qui devient alors très important va imposer un coût à ces mâles, et le processus d'emballement va alors s'arrêter lorsque le coût de ce trait mâle deviendra plus important que l'avantage qu'il procure pour l'accouplement, c'est-à-dire d'être choisi préférentiellement par les femelles (Lande, 1981; Kirkpatrick, 1982). Les traits qui évoluent de cette façon sont appelés « traits arbitraires » car ils peuvent prendre tout type de forme visible et ne fournir aucune information à la femelle au sujet du mâle, excepté son attrait vis-à-vis des femelles. Et on voit donc ici que la sélection sexuelle peut parfois aboutir au maintien d'un caractère non nécessaire.

Le processus de Fisher requiert un ensemble de circonstances particulières mais différentes situations peuvent permettre d'obtenir le trait initial et la préférence qui va avec. L'une des possibilités est l'exploitation sensorielle. Ainsi, si les femelles ont des biais sensoriels préexistants, les mâles avec des traits imitant des stimuli associés à un biais sensoriel, sont plus susceptibles d'attirer l'attention des femelles. Une autre possibilité est le fait que le trait mâle peut être initialement favorisé par la sélection naturelle, et qu'une préférence femelle pour ce caractère peut ultérieurement évoluer. Cependant, comme il subit le processus de Fisher, le caractère mâle est susceptible de devenir exagéré jusqu'au point de perdre son avantage au niveau de la sélection naturelle.

2. 2 La théorie des bons gènes

Parallèlement à la théorie de Fisher, la théorie des bons gènes suggère que des traits phénotypiques mâles coûteux deviennent des cibles pour le choix femelle, car de tels traits reflètent certains aspects de la qualité mâle. Ces traits seraient donc apparus au cours de l'évolution, parce qu'ils renseignaient de manière honnête les femelles sur les qualités

génétiques des mâles. Une femelle qui s'accouple avec un mâle ayant ce type de trait, va en tirer des bénéfices en produisant des descendants mâles et femelles ayant une meilleure espérance de vie. Les traits mâles résultants sont par conséquent appelés ici « traits indicateurs », et les coûts associés sont présumés être des coûts nécessaires. Les modèles génétiques qui expliquent ce processus sont basés sur la coévolution de trois paramètres : le trait indicateur mâle, la viabilité intrinsèque mâle et la préférence femelle pour ce trait. Différents modèles ont été proposés (Zahavi, 1975; Maynard Smith, 1976; Maynard Smith, 1985; Andersson, 1986; Kirkpatrick, 1986; Pomiankowski, 1987; Pomiankowski, 1988; Tomlinson, 1988; Hasson, 1989; Hasson, 1990; Iwasa et al., 1991), tels que la théorie du handicap et le modèle condition-dépendant.

Les modèles de Fisher et des bons gènes décrits ci-dessus supposent que les conséquences sur la fitness du trait mâle demeurent héritable en dépit d'une forte sélection sexuelle directionnelle qui devrait à terme éroder la variance génétique additive du trait sélectionné. Normalement, le gain de fitness associé au choix s'amointri sous cette circonstance et l'avantage de choisir des mâles bons ou attrayants devrait par conséquent décliner. Des théoriciens ont soutenu que des mécanismes spécifiques devaient fonctionner afin de maintenir ou de réintroduire des variations héréditaires dans le trait, tels que des pressions de mutations biaisés, de la sélection pour la variabilité, ou bien encore des pressions de sélection environnementale qui peuvent varier de façon temporelle et spatiale (Hamilton and Zuk, 1982; Pomiankowski et al., 1991; Iwasa et al., 1991).

2. 3 Les bénéfices directs

Enfin, la théorie des bénéfices directs est un autre type de modèle qui élimine le besoin d'une fitness héritable. Les mâles se différencient par un trait phénotypique non héritable qui indique aux femelles le potentiel d'avantages directs qu'elles obtiendront en choisissant de s'accoupler avec ce mâle. Par exemple, le choix des femelles peut être orienté envers des mâles qui vont fournir aux femelles des substances nutritives appelés « cadeaux nuptiaux », lors de l'accouplement (Thornill and Alcock, 1983).

Ces différents modèles concernant la sélection intersexuelle ne sont pas exclusifs. Ils peuvent agir simultanément ou dans une séquence évolutive et les distinctions entre eux commencent à s'estomper. Par conséquent il est souvent difficile de reconstruire l'histoire évolutive d'un caractère mâle particulier. Il est pourtant possible de trouver dans la nature chez un grand nombre d'espèces, une multitude de traits mâles semblant être préférés par les femelles et qui font partie de l'un des trois modèles de base.

Un grand nombre d'études ont donc cherché à expliquer la présence de ce choix femelle et plus particulièrement en absence de bénéfices directs (Kotiaho et al., 2001; Kokko et al., 2002; Kokko et al., 2003; Kokko et al., 2006) avec une distinction entre les 2 modèles principaux, bien qu'aujourd'hui ces 2 modèles sont le plus souvent traités ensemble. La première école traite plutôt de la théorie de Fisher (Lande, 1981; Kirkpatrick, 1982; Pomiankowski et al., 1991) et la seconde école s'intéresse à la théorie des bons gènes (Andersson, 1986; Pomiankowski, 1987; Pomiankowski, 1988; Iwasa et al., 1991; Rowe and Houle, 1996; Kokko, 1998).

2. 4 Reproduction dans le cadre d'un lek

Ainsi, des espèces qui présentent la particularité de se reproduire sous forme de lek, vont être très intéressantes à observer car c'est ici la meilleure situation pour comprendre et expliquer l'existence et la persistance d'un choix femelle malgré l'absence de bénéfices directs.

Dans le cadre des leks, il est possible d'observer des mâles paradant sur des arènes à proximité les uns des autres et où la femelle va alors choisir un partenaire. Dans ce cas précis de parades nuptiales, les femelles ne reçoivent aucune ressource matérielle de la part des mâles mais pourront obtenir des bénéfices indirects (génétiques). Les différents mâles présents vont alors occuper et défendre leur petit territoire d'accouplement, que les femelles visitent seulement dans le but de trouver un partenaire pour la reproduction. Ces mâles peuvent ainsi combattre individuellement avec leurs voisins et utiliser des signaux visuels ou sonores extravagants tels que des danses d'accouplement ou bien encore différents types de vocalisations.

Ce comportement de lek, décrit en premier par les ornithologues, est ainsi courant chez les oiseaux tels que le Tétraz des armoises (*Centrocerus urophasianus*), (**Figure 1**), l'Outarde canepetière (*Tetrax tetrax*) ou le Colibri à queue large (*Selasphorus platycercus*). Il apparaît également chez certains mammifères comme les Cobes de Buffon (*Kobus kob*) ou le Topi (*Damaliscus korrigum*), chez certains poissons de la famille des cichlidés, chez des amphibiens comme la rainette verte (*Hyla arborea*) et même chez des insectes comme les moucheron ou les pyrales telle que l'espèce *Achroia grisella* qui est notre modèle d'étude (Thornhill and Alcock, 1983; Bradbury, 1985).



Figure 1 : Tétraz des armoises (*Centrocerus urophasianus*) sur un lek.

2. 5 Paradoxe du lek

Dans un système de reproduction de type lek, les différents traits sexuels des mâles vont avoir une significativité importante vis-à-vis des femelles car ces derniers ne leurs fournissent pas de ressources, ou bien même des soins parentaux. Malgré l'absence de bénéfices directs, comment expliquer que les femelles montrent une préférence pour certains mâles ? Une raison provient du fait que les femelles vont obtenir des bénéfices indirects, suite à leur choix, qui peuvent être sous forme de « bons gènes » pour leur descendance (Kirkpatrick and Ryan, 1991). Or, l'un des problèmes majeurs non résolus dans la théorie de la sélection sexuelle est l'importance des bénéfices indirects (génétiques) qui agissent en tant que force directrice dans le choix du partenaire (Andersson and Simmons, 2006; Qvarnstrom et al., 2006; Kotiaho and Puurtinen, 2007). Ainsi en théorie, en choisissant un mâle qui excelle lors de la parade nuptiale, les femelles gagneront des gènes pour leur progéniture, qui permettront d'accroître leur survie ou leur capacité de reproduction, et donc par conséquent leur fitness. La théorie de Fisher est l'un des processus permettant ici de résoudre le premier paradoxe du lek, qui est le maintien d'un choix de partenaire très fort malgré l'absence de bénéfices directs.

Les femelles vont donc montrer une préférence pour des caractères particuliers présents chez les mâles lorsqu'elles devront en choisir un. Ce choix, va conduire à une sélection persistante des femelles pour des valeurs particulières de traits mâles, ce qui devraient provoquer une érosion puis une élimination de la variance génétique additive des traits sexuels mâles, et ainsi enlever les avantages du choix, même si celui-ci persiste (Miller and Moore 2007). L'énigme du maintien de la variation génétique additive au sein de la population malgré une préférence femelle constante fait référence au second paradoxe du lek (Borgia 1979; Bradbury, 1981; Taylor and Williams, 1982; Höglund and Alatalo, 1995; Kotiaho et al., 2001; Tomkins et al., 2004). Différents mécanismes peuvent alors expliquer le maintien d'une variance génétique additive chez les mâles.

Une première explication peut provenir des traits d'histoire de vie et de la fitness de chaque femelle. En effet, les femelles ont un âge, une expérience, une condition physique,... qui vont être différents d'un individu à l'autre. Ces variations de traits d'histoire de vie affectent probablement leur choix de partenaire et par conséquent ces différentes femelles

doivent faire face à différents trade-offs lors de ce choix. Ceci conduit à des choix différents de la part des femelles et permet ainsi d'expliquer l'observation de variance génétique pour des traits mâles. De même, l'existence d'une sélection fréquence-dépendant de la part des femelles pourrait être aussi une explication plausible quant à la présence de variance génétique pour les traits mâles. Une autre explication concernant une résolution potentielle de ce paradoxe du lek, provient de la théorie de Rowe et Houle. Semblable au principe du handicap, Rowe et Houle soutiennent que les caractères sexuels sélectionnés dépendent de la condition physique. Ce terme condition comprend un grand nombre de loci, incluant ceux impliqués dans le métabolisme, la masse musculaire, la nutrition, etc....(Rowe and Houle 1996). Rowe et Houle revendiquent le fait que la condition maintient la variation génétique malgré la persistance du choix femelle, car le trait mâle est corrélé avec une forte variation génétique pour la condition. Ainsi, plusieurs études ont pu mettre en évidence, une expression des traits mâles dépendante de la condition (Andersson, 1994; David et al., 2000; Holzer et al., 2003; Kotiaho et al., 2001). La variation génétique des traits dépendants de la condition, peut être également maintenue par des mutations et des effets environnementaux. En effet, certains génotypes peuvent être plus efficaces en développant des caractéristiques sexuelles condition-dépendantes, dans différents environnements, tandis que les mutations peuvent être délétères dans un environnement particulier et avantageuses dans un autre (Tomkins et al., 2004). De plus, la balance sélection/mutation peut expliquer le maintien d'une variance génétique. Lorsque beaucoup de gènes influencent un trait sexuel donné, la présence d'un grand nombre de mutations va induire de la variance ; ce qui permet de contrebalancer la sélection qui quand à elle, tend à réduire cette variance.

Nous venons de voir qu'il existe une multitude d'explications concernant la présence de variation génétique pour les caractères sexuels. Cela est d'autant plus facile à mettre en évidence dans les leks où les femelles se focaliseront uniquement sur l'apport de bénéfices indirects. Dans la partie suivante, nous nous attacherons à montrer l'existence de cette variation dans les signaux d'annonce (en particulier les signaux acoustiques) qui interviennent lors de l'appariement et nous nous efforcerons à mettre en évidence les aspects génétiques qui pourraient expliquer la coévolution, ou non, des signaux et de la préférence associée, via l'étude de l'architecture génétique.

III - LES SIGNAUX ANIMAUX

Lors du choix du partenaire, et afin d'avoir une communication optimale entre eux, les animaux vont utiliser différents signaux ayant des modalités différentes tels que les signaux visuels, les signaux chimiques (phéromones par exemple) ou bien encore les signaux acoustiques. Toute communication va impliquer au minimum deux individus et correspond au transfert d'informations par un émetteur vers un receveur, pour l'utilisation ultérieure de cette information par ce dernier. L'émetteur va donc produire un signal, qui va être transmis à travers l'environnement et qui va entraîner une prise de décision du receveur comme une modification du comportement et/ou de l'état physiologique de celui-ci. Ainsi, la nature des signaux émis va donc varier selon le canal utilisé pour transmettre l'information. En effet, les signaux vont devoir être adaptés à l'environnement présent comme l'obscurité par exemple, ainsi qu'à la distance qui sépare les protagonistes. Par exemple, si des signaux visuels sont utilisés, il faudra une qualité et une quantité de lumière ambiante optimale afin de maximiser leur propagation. Leur propagation peut être aussi sensible aux obstacles physiques tels que la végétation. Ces signaux qui représentent un processus physique (généralement une onde ou un signal assimilable à une onde), vont véhiculer l'information et c'est l'émetteur qui va coder l'information dans ces signaux. Cette information sera codée via des paramètres temporels (ex : rythme d'émission), de fréquence (ex : son aigu/grave) et d'amplitude (ex : intensité sonore), pour ce qui concerne les signaux acoustiques. De plus, ils vont être utilisés dans différents contextes comme l'attraction du partenaire, la compétition pour les ressources, la recherche de la nourriture ou bien encore la lutte contre les prédateurs. Parmi tous ces contextes, cette communication animale est notamment indispensable dans l'attraction du partenaire et plus particulièrement ensuite dans le choix de celui-ci.

Voici donc à présent une présentation succincte des deux grands types de signaux qui agissent dans le processus de choix du partenaire :

3. 1. Signaux d'annonce vs signaux de cour

Nous pouvons distinguer et classer les signaux en des signaux dits d'annonce (signaux d'attraction) et des signaux de cour. De par leur rôle, ces deux classes de signaux se caractérisent surtout par leur distance d'action.

3. 1. 1 Les signaux d'annonce

La première particularité de ces signaux provient du fait qu'ils sont diffusés à longue distance. Ils vont permettre à l'émetteur de signaler sa présence mais rien ne permettra de dire si de potentiels individus receveurs seront présents aux alentours, et à une distance permettant leur bonne réception. Ces signaux d'annonce qui permettent de faire une première recherche de congénères sont souvent effectués par les mâles. Le signal émis va devoir être spécifique à l'espèce et doit permettre de donner des informations sur la localisation et la qualité de l'émetteur. Par ailleurs, on constate souvent de la part du receveur, une sélection directionnelle concernant la qualité de l'individu et plutôt une sélection stabilisante pour ce qui concerne l'identité de l'espèce.

Il est possible de constater que les femelles émettent des signaux d'annonce, principalement lorsqu'il s'agira de signaux olfactifs. Cela s'observe fréquemment chez les mammifères, les serpents et les papillons et est dû en partie au coût moindre des signaux olfactifs, par rapport aux coûts élevés des signaux acoustiques et visuels. Les femelles doivent en effet conserver de l'énergie pour la production des œufs et comme elles sont réceptives sur des périodes plus courtes de temps, cela leur permet de réguler et de produire à moindre frais une substance odorante. Chez les insectes, et en particulier chez les lépidoptères, un grand nombre de femelles émettent ainsi des phéromones à longue distance pour attirer les mâles (Wyatt, 2003; Lim and Greenfield, 2007). Il y aura ici un contrôle de l'émission, mais une absence de contrôle concernant la diffusion du signal qui va dépendre de facteurs externes tels que la présence ou non de vent. Une fois qu'un individu a été attiré par le signal d'annonce à longue distance émis par un autre individu, on va pouvoir voir apparaître des signaux de cour.

3. 1. 2 Les signaux de cour

On va donc parler de signaux de cour lorsqu'on observera à proximité deux individus de la même espèce et de sexe opposé. Ces signaux font suite à ceux dits d'annonce et interviennent lors de la finalisation du choix du partenaire. Ils vont donc agir ici à courte distance et la finalité pour l'émetteur sera que ce signal lui permette d'être accepté puis d'être choisi par le receveur. Ce dernier va quant à lui, et grâce à ce signal de cour, pouvoir évaluer la qualité de ce partenaire potentiel. Comme l'investissement des mâles en gamètes est moindre par rapport à celui des femelles, ils vont le plus souvent jouer un rôle actif durant la cour. En effet, les erreurs du choix de partenaire pour les femelles étant plus coûteuses, ces dernières vont donc évaluer attentivement les mâles et signaler par la suite leur acceptation ou leur rejet. La courte portée des signaux de cour va permettre l'utilisation et l'observation de différentes modalités de signaux. Ainsi, il est possible d'observer des signaux tactiles, des signaux chimiques qui seront détectés par les antennes par exemple, ou encore des signaux acoustiques et visuels qui pourront être réduits en intensité en raison de la proximité des individus. De plus, en raison de cette proximité, les signaux de cour vont donner une information plus précise quant à la position de l'individu émettant le signal. En effet, des animaux émettant des signaux acoustiques peuvent orienter leurs corps pour que le receveur perçoive le son le plus fort possible tandis que des substances olfactives pourront être vaporisées sur ces receveurs. Ces signaux de cour semblent donc indispensables dans le processus de choix du partenaire et présentent une forte variabilité interspécifique et intraspécifique quant à leurs modalités.

Nous venons donc de voir qu'il existe une multitude d'informations transmises par les signaux et de manières différentes selon l'environnement. Ces différents signaux vont de plus souvent utiliser plusieurs canaux de communication simultanément et vont donner des informations au receveur sur l'identité spécifique et les caractéristiques individuelles de l'émetteur (état physiologique, réceptivité sexuelle, niveau d'agressivité, statut social, histoire de vie, etc....). Nous allons à présent nous attacher à mieux comprendre l'impact de ces signaux dans le processus de sélection sexuelle.

3. 2 Rôle des signaux dans le choix du partenaire sexuel

Lors des périodes de reproduction, les interactions entre mâles et femelles vont souvent être propices à des conflits. En effet, il faut se souvenir que l'on peut souvent supposer un conflit d'intérêts entre mâles et femelles. Les mâles ont intérêt à s'accoupler avec le plus de femelles possibles, car c'est ainsi qu'ils peuvent maximiser leur reproduction, alors que les femelles doivent choisir de manière la plus discriminative possible, le mâle qui maximisera leur propre reproduction. Afin de choisir leur partenaire sexuel, les femelles sont supposées vouloir des signaux honnêtes et fiables (non trompeurs) pour pouvoir identifier tout d'abord l'espèce puis le sexe des partenaires potentiels et ainsi obtenir des informations justes afin que la reproduction puisse se faire efficacement et apporter le plus de bénéfices possible par la suite. Les femelles vont alors dépendre des mâles pour garantir leur succès reproducteur mais les 2 sexes vont tout de même obtenir un avantage mutuel à s'accoupler.

Pour optimiser leur choix, les femelles vont donc devoir discriminer et analyser les différents signaux des mâles. Cependant, il faut que les femelles puissent distinguer parmi tous les signaux, ceux supposés fiables afin d'optimiser leur choix de partenaire. Ainsi, Amotz Zahavi donna en 1975, une explication au comportement de certaines femelles, chez les oiseaux, qui choisissaient les mâles avec le plus lourd handicap ornemental (très longues plumes par exemple). Il déclara que les caractéristiques sexuelles mâles donnaient des informations utiles aux femelles, seulement si ces traits conféraient un handicap aux mâles. En effet, dans l'hypothèse où la parade nuptiale a un effet neutre sur la survie, les mâles pourraient tout simplement tricher en paradant de la même façon et le signal perdrait alors sa signification pour les femelles. D'un autre côté, si la parade nuptiale est préjudiciable pour la survie du mâle, avec par exemple une augmentation du risque de prédation ou un coût en énergie et en temps pour ce dernier, cette parade devient alors un indicateur permettant aux femelles d'évaluer la qualité des différents mâles. Ainsi, les mâles qui excellent ici dans les parades prouvent qu'ils sont de meilleures qualités et possèdent des gènes supérieurs à ceux des mâles « normaux », car ils ont réussi à supporter les coûts associés à ces différents traits. Sous cette théorie appelée « principe du handicap », les femelles vont alors préférer les mâles qui présentent les ornements les plus coûteux.

L'évolution a donc développé des solutions permettant aux animaux d'émettre des signaux « honnêtes » et dignes de confiances entre individus qui pourraient avoir plutôt tendance à tromper l'autre. Le principe du handicap suggère que des signaux fiables doivent

être coûteux pour le signaleur et un individu qui n'a pas la qualité requise ne pourra pas supporter ces coûts. Cette théorie propose ainsi une explication pour certains comportements et caractéristiques anatomiques apparemment aberrants du point de vue évolutif, et qui sembleraient à première vue réduire les chances individuelles de survie de l'animal qui les exhibe. Ce principe a donné lieu à un certain nombre de débats et de désaccords, et les idées que Zahavi expose quant à l'importance que tiennent les handicaps dans le domaine de la biologie restent marginales pour certains (Pomiankowski and Iwasa, 1998). Néanmoins, la théorie du handicap a connu un certain succès (Johnstone, 1995; Johnstone, 1997), et la plupart des chercheurs dans ce domaine pensent qu'aujourd'hui, elle permet d'expliquer certains aspects de la communication animale.

Après avoir vu que l'honnêteté des signaux était un facteur important de la communication animale, nous allons voir dès à présent les différents types de signaux mâles qui existent et qui peuvent être transmis, en se focalisant plus particulièrement par la suite sur les caractères présentant des signaux acoustiques.

On peut observer tout d'abord, la présence de traits anatomiques, qui sont transmis ici de façon visuelle et se présentent sous différentes formes, telles que des tâches de couleur, un panache de plumes, des queues et des nageoires allongées ou bien encore d'autres structures corporelles que l'on appelle des ornements. Ainsi, par exemple chez le pinson *Carpodacus mexicanus*, la femelle va choisir des mâles ayant de grandes tâches rouges sur le plumage (Hill, 1990; Hill, 1991), tandis que chez la grande bécassine *Gallinago media*, les femelles vont préférer des tâches blanches sur la queue (Höglund et al., 1990). De même, d'autres études ont mis en évidence une préférence femelle pour une queue plus longue chez 4 espèces d'oiseaux ayant des systèmes de reproduction différents (Andersson, 1994).

On observe également des signaux visuels induits par des mouvements lors des parades. Ces différents mouvements sont susceptibles d'être coûteux en énergie en étant effectués de manière répétée (Vehrencamp et al., 1989; Mappes et al., 1996). L'un des exemples les plus connus, est celui du tétras des armoises, *Sage grouse*, qui est une espèce ayant une reproduction de type lek. Dans ce cas précis, tout type de bénéfice direct peut être exclu (pas de cadeaux nuptiaux, pas de soins paternels), et l'intensité du signal peut être un indicateur condition-dépendant honnête de l'endurance ou de l'aptitude physiologique du mâle signaleur. Donc, si des mâles de faibles qualités payent un coût plus important pour un

certain niveau de signal, les conditions sont alors réunies pour dire que le signal est honnête. Des structures externes peuvent également intervenir dans le cadre de la sélection sexuelle chez certaines espèces d'oiseaux. En effet, pour attirer les femelles, chez l'espèce du jardinier satiné (*Ptilonorhynchus violaceus*), des mâles construisent des tonnelles élaborées et décorées avec des fruits, des fleurs ou bien encore des coquillages (Borgia, 1985; Diamond, 1991). Il est intéressant de noter que pour des espèces ayant des tonnelles très élaborées, leur coloration est plus terne, ce qui suggère un changement progressif de l'évolution de l'ornementation du corps vers l'ornementation de la tonnelle. En outre, la tonnelle est aussi un indicateur de la dominance, de l'âge et de l'expérience du mâle.

Par ailleurs, il est possible de noter la présence de signaux olfactifs, qui permettent aux femelles de sélectionner leur partenaire. Dans la plupart des cas, l'odeur préférée est corrélée avec le degré de domination masculine comme chez la souris domestique, *Mus domesticus* (Mossman and Drickamer, 1996) et l'honnêteté peut être maintenue par les interactions intrasexuelles et les coûts sociaux. Enfin, il existe un dernier grand type de signaux ; il s'agit des signaux acoustiques.

Chez les espèces où l'activité nocturne est intense, la présence de ces signaux est indispensable. Observés chez des mâles de différentes espèces d'oiseaux, de mammifères, d'anoures ou bien encore d'insectes, ces signaux sont des cibles évidentes du choix femelle (Tauber and Eberl, 2003; Nakano et al., 2006; Musolf et al., 2010). Dans tous ces groupes, il existe une multitude d'exemples dans lesquels les femelles préfèrent des mâles avec des signaux présentant un fort taux d'appel, une forte intensité du son et/ou une forte durée de l'appel (Andersson, 1994). L'étude de la communication acoustique chez les animaux et plus particulièrement chez les insectes semblent un élément important pour mieux comprendre les différents processus intervenant dans le cadre du choix du partenaire. En effet, depuis très longtemps, des observations sur le terrain suggèrent que les signaux acoustiques produits par les insectes mâles servent à attirer les femelles (Rösel v. Rosenhof, 1749) et des expériences de playback ont prouvé chez les grillons par exemple, que le son seul était suffisamment efficace pour attirer des femelles. Malgré de nombreuses études sur les signaux émis par les mâles permettant un choix des femelles, il est possible d'observer une inversion des rôles où la femelle n'est plus celle qui choisit. Le choix va alors être effectué par les mâles ; ce qui s'observe beaucoup chez les insectes (Bonduriansky, 2001).

3. 3. Caractéristiques des signaux acoustiques

Afin de mieux comprendre l'origine de la variation observée pour des signaux acoustiques, il est primordial de déterminer les différentes caractéristiques qui composent ces signaux tout en utilisant des tests appropriés.

3. 3. 1 Tests de préférences acoustiques

Ainsi dans le cadre de l'étude des signaux acoustiques, des expériences de playback sont nécessaires car d'autres types de signaux (signaux olfactifs, visuels) peuvent permettre d'attirer le partenaire, d'influencer les décisions pour s'accoupler ou bien encore de repousser les rivaux (Otte, 1977; Wells, 1977b). De plus, l'utilisation de sons synthétiques, dont les propriétés physiques varient systématiquement, peut permettre de découvrir les principales caractéristiques (et leurs valeurs optimales) requises, par les individus qui perçoivent le signal, afin d'initier des réponses comportementales appropriées et de localiser les individus émettant ces signaux (Gerhardt, 1994; Helversen, 1997). Par ailleurs, la possibilité de déterminer les critères acoustiques utilisés pour évaluer les signaux, permet de définir les principes de fonctionnement par lesquels le système nerveux extrait des informations biologiques importantes à partir des signaux de communication envoyés.

Par conséquent, il est nécessaire de réaliser des expériences de playback afin de déterminer le mode de choix du partenaire au sein d'une espèce (préférences femelles) ou, idéalement, pour estimer les fonctions de préférence, qui permettent de quantifier la force de ces dernières pour des propriétés acoustiques ayant des valeurs particulières. De plus, l'utilisation de ces tests de choix à la place de ceux utilisant un seul stimulus permet d'avoir des résultats plus sensibles car ces derniers permettent de révéler des préférences fondées sur de très petites différences pour un élément précis et important du signal. L'utilisation de 2 signaux permet aussi une certaine discrimination de la part de l'individu. Cependant, il faut noter que les modalités de préférence sont mieux déterminées lorsque l'on prend en compte le comportement d'échantillonnage des femelles, qui influe également sur le choix du partenaire (Wagner, 1998). Ainsi, des playbacks avec un seul stimulus, permettant d'évaluer l'intensité de la préférence en termes de probabilité de réponse ou bien de l'exactitude de l'orientation et de la vitesse des réponses, sont appropriés pour des espèces chez lesquelles les femelles

échantillonnent les signaux mâles de manière séquentielle. A l'inverse les expériences de choix (deux stimuli ou plus), sont adaptées à des espèces où les femelles peuvent entendre et évaluer plusieurs mâles à partir d'un même point.

3. 3. 2 Paramètres analysés du signal

Lors du choix du partenaire, les femelles vont donc devoir analyser les signaux reçus afin d'engager une réponse sexuelle vers tel ou tel individu. Pour les individus émetteurs, le fait de maintenir les caractéristiques des signaux est parfois très coûteux en énergie et si la capacité à maintenir ces signaux est corrélée avec toutes les capacités physiologiques, ces signaux sont alors considérés comme des indicateurs de la condition de l'individu émetteur.

En réalité, les femelles semblent préférer précisément ces caractéristiques du signal qui sont les plus coûteuses en énergie. Par exemple, une étude menée sur la rainette versicolore, *Hyla versicolor*, a démontré que les femelles préféraient des chants longs répétés avec un faible rythme, plutôt que des chants courts répétés plus fréquemment (Gerhardt et al., 1996). Ces chants sont coûteux à produire, ce qui suggère que la vigueur du signal est un indicateur honnête de la qualité du mâle. Aussi, chez certaines espèces, le rythme du signal est un bon indice concernant les bénéfices directs que les femelles peuvent espérer, tels que des grands spermatophores ou des territoires riches en ressources (Gwynne, 1982; Alatalo et al., 1990). Tandis que d'autres caractéristiques sonores tels que la fréquence, la qualité de l'imitation, la variabilité des notes ou bien encore la taille du répertoire ne sont généralement pas corrélées avec les coûts énergétiques et sont plus susceptibles de fonctionner comme des traits indicateurs ou des traits fisherians.

Indéniablement, on observe une préférence envers des caractéristiques du signal coûteuses à produire, c'est pourquoi nous allons voir à présent différents critères importants présents dans le chant et plus particulièrement chez les oiseaux, les anoures et les insectes qui sont les organismes les plus étudiés.

L'un des premiers critères concerne le niveau d'intensité acoustique du signal. On observe par exemple, une préférence active pour des chants de plus fortes amplitudes chez le Diamant mandarin, *Taeniopygia guttata* (Ritschard et al., 2010). Chez les insectes et les anoures, les femelles présentent aussi, habituellement une phonotaxie vers le plus intense des deux sons, lorsque ces sons sont identiques pour tous les autres paramètres. Dans la plupart

des tests, des différences de 2-3 dB sont suffisantes pour susciter une préférence marquée (Forrest and Raspet, 1994; Jang and Greenfield, 1996).

Malgré la grande variabilité des modèles expérimentaux et des méthodes d'analyse, une conclusion quasi-universelle est que le taux de pulses est la propriété temporelle la plus importante utilisée pour la sélection du signal par les femelles. Les pulses représentant ici un signal sonore régulier produit par un animal donné. Cette préférence existe par exemple chez le grillon domestique, *Acheta domesticus*, où les femelles préfèrent des mâles émettant un grand nombre de pulses. Les femelles sélectionnent ainsi ici des grands mâles car le nombre de pulses est corrélé positivement avec la taille de l'individu (Gray, 1997). Le rythme d'émission du signal va donc être aussi un élément clé dans le choix du partenaire, même si d'autres propriétés temporelles comme la durée d'un pulse ou bien encore la durée totale d'émission de ces pulses sont à prendre en compte.

3. 3. 3 Fiabilité du signal

La variation des propriétés dynamiques (comme la fréquence d'émission du chant d'appel ou bien encore le taux de pulses) est influencée par l'activité acoustique des rivaux et il existe de fortes corrélations directes associées aux coûts énergétiques du signal. Aussi, l'existence de signaux coûteux va jouer un rôle important concernant la théorie du handicap (Andersson, 1994). De plus, les mâles qui produisent des signaux ayant des propriétés dynamiques très élevées pourraient aussi être plus visibles pour les prédateurs. Ainsi, la variation des propriétés dynamiques est susceptible, en général, d'être corrélée avec les coûts énergétiques et de prédatons liés à l'attraction des partenaires chez les mâles. Ces signaux peuvent donc être des indicateurs fiables de la capacité à concourir des mâles.

Si les femelles tirent des avantages directs ou indirects de l'accouplement avec un mâle produisant des signaux ayant des propriétés dynamiques élevées, alors les modèles de préférence qui sont fortement directionnels, et qui sont fondées sur ces propriétés ne sont pas surprenants.

En conclusion, la prédominance de fonctions de préférence fortement directionnelle pour les propriétés dynamiques du signal correspond à l'hypothèse selon laquelle ces propriétés peuvent être des indicateurs fiables des bénéfices directs ou indirects que les femelles pourraient recevoir en choisissant des mâles produisant des valeurs

élevées pour ces propriétés. Pour une analyse plus fine qui permettra d'estimer la qualité du partenaire, on observe donc une préférence directionnelle, alors qu'une préférence stabilisante intervient principalement dans la reconnaissance spécifique.

De part leur nature, les signaux acoustiques peuvent ainsi transmettre et donner en quelque sorte un grand nombre d'informations qui vont être très utiles lors du choix du partenaire. Les femelles montrent ainsi une préférence pour un signal particulier et on s'attend par conséquent à ce que tous les individus mâles au sein d'une même population aient un signal très proche afin d'être choisi. Or, on observe dans la plupart des cas une variance phénotypique pour ces types de traits sexuels. Par conséquent, quelles sont les mécanismes qui expliquent la persistance d'un choix et une évolution des différents traits sexuels ?

3. 4 Mécanismes permettant de conserver une variance génétique

Pour pouvoir mettre en évidence l'existence de cette variance génétique tout en déterminant son origine, et expliquer ainsi la modification et l'évolution des traits sexuels, il est ici nécessaire de connaître l'architecture génétique des traits agissant dans ce processus de sélection sexuelle ; c'est-à-dire les traits du signal et ceux de la préférence. De même, il va être intéressant de comprendre les relations génétiques entre ces traits pour mieux expliquer les différents phénomènes observés.

Une première explication concernant une variation des traits sexuels (préférence femelle, propriétés du signal mâle,...) peut être obtenue par le phénomène d'interactions génotype-environnement, où un même génotype ne donnera pas le même phénotype selon l'environnement dans lequel l'individu se trouvera. En effet, l'environnement peut avoir une incidence sur la qualité d'un trait donné et par conséquent un individu choisi dans un environnement "A" pour ce trait ne sera pas choisi dans un environnement "B" pour ce même trait. Dans cet environnement "B" la femelle choisira un autre individu qui aura un trait moins bon dans l'environnement "A". Ainsi, l'importance des interactions génotype-environnement sur la sélection sexuelle commence à intéresser de plus en plus la communauté scientifique (Ingleby et al., 2010). Néanmoins en dépit de l'importance du choix femelle dans le processus de sélection sexuelle, il y a peu d'études concernant la variation génétique de la préférence (Bakker and Pomiankowski, 1995; Mead and Arnold, 2004; Narraway et al., 2010). Par

ailleurs, peu de choses sont connues concernant le rôle des interactions génotype-environnement pour des traits sexuels et sur une coévolution de ces traits (Welch, 2003; Greenfield and Rodriguez, 2004). Les études concernant ce type d'interactions sont en plein développement et sont un moyen d'expliquer le paradoxe du lek en permettant de donner une explication à l'origine de la variation présente dans la préférence et le signal (Tomkins et al., 2004; Radwan, 2008; Bussière et al., 2008).

De même, l'évolution des traits mâles et ceux de la préférence femelle, ainsi que le processus génétique qui est susceptible de coordonner les individus qui émettent et reçoivent les signaux, peut s'expliquer par l'existence d'un déséquilibre de liaison entre les gènes qui influencent ces traits. Ce déséquilibre peut se produire suite à un croisement non aléatoire (croisement non aléatoire dans lequel le choix du partenaire est influencé par le phénotype) attendu par les modèles de Fisher et du handicap (Bakker and Pomiankowski 1995). De plus, il peut s'expliquer par la proximité et ainsi une liaison physique des locus qui va par conséquent accélérer l'évolution des traits du signal et ceux du receveur vers des niveaux exagérés. La présence de déséquilibre de liaison peut donc amener à l'existence de corrélations génétiques entre le signal mâle et les traits de la préférence femelle et permettre ainsi de mieux comprendre l'évolution et la présence de variation dans les signaux ainsi que dans la préférence des femelles pour ceux là même.

Finalement, l'enjeu principal est de déterminer et de localiser les gènes majeurs impliqués dans les signaux et les préférences afin de pouvoir expliquer grâce à l'architecture génétique les raisons qui amènent à une corrélation génétique, ou non, de ces traits. On pourra ainsi connaître les liens qui existent ou non entre les gènes responsables des différents traits sexuels. De même, expliquer le mécanisme de Fisher sera d'autant plus facile, si deux gènes impliqués pour le premier dans le signal masculin et le second dans la préférence femelle, sont proches ou identiques (expliqué par le phénomène de pléiotropie). Ceci permettra également de connaître au mieux l'origine de la variance génétique des différents caractères sexuels. Pour se faire, nous allons utiliser un papillon acoustique *Achroia grisella*, qui se reproduit sous forme de lek et essayer d'expliquer le processus de sélection sexuelle sur un plan aussi bien comportementale que génétique.

IV - *ACHROIA GRISELLA*, UN PAPILLON ACOUSTIQUE PARTICULIER

Dans le cadre de la sélection sexuelle et afin de mieux comprendre les processus qui agissent lors du choix du partenaire nous avons utilisé comme espèce modèle, un papillon acoustique, *Achroia grisella* (**Figure 2**). Cette espèce a un intérêt tout particulier car elle a un système de reproduction de type lek et va donc nous permettre de déterminer les critères que les femelles vont utiliser afin de sélectionner leur partenaire, en l'absence de bénéfices directs. De plus, il sera intéressant de comprendre comment le choix de la femelle va-t-il être influencé par les différents types de signaux mâles qui varient au cours du temps.



Figure 2 : Mâle (gauche) et femelle (droite) de la petite fausse teigne, *Achroia grisella*.

Chez le papillon acoustique *Achroia grisella* Fabricius (Lepidoptera : Pyralidae : Galleriinae), les mâles se regroupent sous forme de lek et attirent les femelles avec un chant d'appel constitué d'un train continu de pulses ultrasoniques (Spangler et al., 1984; Snedden et al., 1994). Contrairement à la plupart des papillons, chez lesquels l'appariement est caractérisé par un signal olfactif (phéromones) provenant de la femelle et par une recherche active du mâle ; chez *Achroia grisella*, la production d'un signal ultrasonique par le mâle est suffisante pour attirer les femelles réceptives.

Ainsi, dans la nature, *Achroia grisella* est un symbiote des abeilles à miel, *Apis mellifera*, et peut vivre à partir des détritux organiques accumulés, soit dans les ruches ou à proximité des colonies d'abeilles (Greenfield and Coffelt 1983). On trouve plus facilement les papillons dans des colonies dites « faibles » ou en fin de vie, que dans des colonies où l'on observe une forte proportion d'ouvrières. Les larves d'*Achroia grisella* se nourrissent donc à partir de la matière organique présente dans ces endroits et après l'éclosion, les adultes quittent immédiatement la colonie si des ouvrières sont présentes et restent par la suite à proximité.

Les mâles produisent leur chant d'appel pendant 6 à 10 heures au début de chaque nuit et restent immobiles sur un substrat pour battre des ailes avec un rythme de 35 à 50 cycles par seconde. Ce signal est émis par un petit organe de chant : les timbales, qui se trouvent à la base de chaque aile antérieure. Chaque résonance conduisant à un pulse de sons de 80 à 130 μ s ayant des fréquences allant de 70 à 130 kHz et une forte intensité [amplitude de pic = 90 à 95 dB SPL (sound pressure level) à 1 cm ; 0 dB SPL = 20 μ Pa]. De plus, comme les timbales droite et gauche ne résonnent pas en parfaite synchronie ; on a normalement durant les mouvements ascendants et descendants des ailes, la production de 2 pulses, séparés par un bref intervalle appelé « intervalle asynchrone ». Ainsi, un mâle battant des ailes va générer des paires de pulses avec un rythme allant de 70 à 100 paires de pulses par seconde. Enfin, l'amplitude des pulses de sons fluctue de plusieurs décibels entre chaque paires de pulses et entre les deux pulses appartenant à une même paire.

Concernant les femelles *Achroia grisella*, ces dernières courent, plutôt qu'elles ne volent, vers un mâle chantant et cette phonotaxis existe pour des distances allant jusqu'à 1 mètre (Greenfield and Coffelt 1983). En outre, elles s'accouplent normalement une seule fois et deviennent par la suite non réceptive aux chants d'appel des mâles (Greenfield and Coffelt 1983). Par ailleurs, des études sur plusieurs populations d'*Achroia grisella*, montrent que l'attractivité des mâles envers les femelles est prédite par 3 caractères majeurs de leur signal ; il s'agit de l'amplitude des pulses, du rythme des paires de pulses et de l'intervalle asynchrone. En effet, des expériences de playback ont montré que les femelles préfèrent des chants mâles avec des paires de pulses comportant, des pulses de longue durée ayant une forte intensité, délivrés à des rythmes élevés et qui ont de grands intervalles asynchrones (Jang and Greenfield, 1996; Jang et al., 1997; Jang and Greenfield, 1998). Ces trois caractères du signal varient beaucoup d'un mâle à un autre et d'une population à une autre, mais sont fortement reproductibles chez les individus (Jang et al., 1997). Enfin, le choix des femelles pour des

valeurs supérieures aux valeurs moyennes de la population mâle indique aussi la possibilité d'une sélection directionnelle imposée par le choix femelle.

Aussi, en raison de la sélection sexuelle qui engendre une sélection directionnelle aux différents traits du chant mâle, cela devrait provoquer une diminution de la variance génétique de ces traits. Or, on observe très souvent que les traits mâles (rythme, amplitude, intervalle asynchrone) favorisés par le choix femelle, conservent encore des quantités importantes de variance génétique additive. Différentes études ont ainsi essayé d'expliquer la persistance de cette variance. En premier lieu, il a été montré que les interactions génotype X environnement pouvaient maintenir l'existence d'une variance génétique additive pour les caractères du signal mâle chez *Achroia grisella* (Jia et al., 2000; Rodriguez and Greenfield, 2003; Danielson-François et al., 2006; Danielson-François et al., 2009). De plus, d'autres études ont mis en évidence qu'une grande partie de la variation du chant mâle pouvait s'expliquer par la variance génétique additive observée pour la masse corporelle des individus mâles (Brandt and Greenfield 2004).

De plus, en raison d'une communication qui utilise des fréquences ultrasoniques (70-130 kHz), *Achroia grisella* est capable d'entendre et de détecter les signaux d'écholocation provenant de chauves-souris glaneuses ou chassant en milieu aérien. Ainsi, les papillons en vol ou courant sur un substrat vont présenter des comportements de défense en réponse aux écholocalisations de ces prédateurs. Ils vont respectivement soit se laisser tomber sur le sol soit cesser leur mouvement. Les femelles *Achroia grisella* vont également devoir discriminer les signaux d'accouplement émis par les mâles (sélection sexuelle), des écholocations de chauves-souris (sélection naturelle). Pour ce faire, il existe 2 différences assez importantes entre les signaux des congénères et ceux des chauves-souris. Les mâles ont un taux de pulses plus important ($> 60 \text{ sec}^{-1}$) par rapport aux écholocations de chauves-souris et en phase de recherche, ces dernières émettent de longs pulses ($\geq 1 \text{ msec}$).

Un autre intérêt chez cette espèce, réside dans le fait que les individus possèdent un proboscis atrophié. Par conséquent, ils ne se nourrissent pas au cours de leur vie adulte et vont donc investir toute leur énergie et consacrer tout leur temps afin de se reproduire. De plus un autre intérêt réside dans la durée de développement chez cette insecte qui est très rapide : environ une trentaine de jours entre la ponte et l'émergence d'un nouvel individu ; ce qui permet d'obtenir assez rapidement des individus issus de croisements spécifiques. Comme les soins paternels ou d'autres bénéfices matériels semblent inexistantes, le choix femelle pour les signaux mâles chez *Achroia grisella*, semble basé principalement sur les bénéfices génétiques

et maintenu par un mécanisme de sélection sexuelle indirecte. Cette espèce paraît donc une espèce modèle afin de mieux étudier et comprendre les différents mécanismes agissant dans le cadre de la sélection sexuelle chez une espèce de lépidoptère ayant une communication acoustique.

L'objectif général de cette thèse a donc été d'étudier les mécanismes de la sélection sexuelle chez un papillon acoustique, *Achroia grisella*, en essayant de mieux comprendre et de mettre en évidence les liens existant entre les signaux des mâles et la préférence des femelles. Plus spécifiquement, le premier chapitre de l'étude traite de l'évaluation des signaux mâles par les femelles. Pour ce faire, une approche comportementale a été utilisée pour tenter de montrer comment les femelles répondent aux variations d'intensité des signaux mâles présents dans la nature. En effet, dans le contexte de la sélection sexuelle, la compréhension des préférences femelles est indispensable pour expliquer la variation des signaux observés dans la population mâle. Ensuite, pour mieux comprendre la présence d'une coévolution entre les signaux et la préférence, il a été nécessaire de déterminer les relations génétiques entre ces différents traits. Ainsi, le deuxième chapitre va présenter des études comportementales combinées à des études génétiques pour tenter de montrer ces relations. Par la réalisation de la première carte génétique chez cette espèce de pyrale et par la localisation de QTL (quantitative trait locus) qui influencent le signal mâle et la préférence femelle, nous avons essayé de mettre en exergue la nature des traits impliqués dans le processus de sélection sexuelle chez ce papillon acoustique.

- CHAPITRE 1 -

Evaluation du chant mâle : les femelles répondent
aux notes fortissimo

Mon premier objectif lors de cette thèse a été d'essayer de mettre en évidence la façon avec laquelle les femelles *Achroia grisella* utilisent les informations émises via le signal ultrasonique des mâles. En effet, le signal des mâles présente différentes propriétés qui vont être déterminantes dans le processus de choix des femelles. Parmi, toutes ces propriétés du signal, l'une d'entre elles est fréquemment étudiée ; il s'agit de l'intensité du signal.

Ainsi, dans le cadre de la sélection sexuelle et chez des espèces qui se reproduisent sous forme de lek, l'intensité du signal est primordiale afin que l'individu puisse maximiser ses chances de reproduction. Cependant, l'intensité est un paramètre très complexe du signal en raison principalement de sa variation au cours du temps. Les femelles vont donc devoir évaluer les différents signaux des mâles qu'elles vont rencontrer et montrent généralement une préférence pour des chants ayant un rythme élevé et aussi pour des chants avec une forte intensité. Une première étude a alors indiqué que les femelles étaient capables de discriminer les chants mâles en se basant sur la puissance acoustique qui est la résultante de l'amplitude du signal avec le rythme d'émission des paires de pulses (Greig and Greenfield, 2004). Les femelles préféraient alors des signaux ayant une forte puissance. Malgré cette étude, le paramètre de fluctuation du signal n'était toujours pas pris en compte alors que ce dernier joue certainement un rôle important dans l'évaluation faite par les femelles.

Afin de déterminer une préférence des femelles pour un signal ayant une intensité constante, ou à l'opposé pour un signal avec une intensité qui fluctue au cours de l'émission ; j'ai utilisé, lors de ces diverses expériences, des signaux ayant la même puissance acoustique pour pouvoir analyser seulement le paramètre de l'intensité.

Suite à ces différentes expériences concernant la préférence des femelles face à des signaux présentant des fluctuations d'intensité, une nouvelle question devenait évidente : Est-ce que les mâles *Achroia grisella* présentent-ils ou non des variations d'intensité dans leurs signaux respectifs ? En effet, il est peut être utile pour des mâles d'avoir un signal non constant, ce qui va lui permettre de chanter plus fort par moment et par conséquent d'attirer plus fortement les femelles. Cependant, ceci peut amener à une augmentation du risque de prédation car ces individus vont être plus repérables. De même, chanter à des intensités plus fortes par moment, engendre des coûts énergétiques ce qui peut amener à ce que des signaux qui fluctuent et présentent de fortes intensité durent moins longtemps que des signaux

constants sans fluctuations. Les mâles sont donc probablement confrontés à un trade-off pour émettre leur signal. Un enregistrement du signal de plusieurs mâles et une analyse fine de ces signaux concernant leur fluctuation naturelle permettra alors de vérifier si il existe ou non une fluctuation naturelle des signaux.

Cette étude comportementale qui combine ainsi les préférences des femelles pour des signaux présentant des fluctuations d'intensité particulières et une analyse précise des signaux mâles existant dans la nature va permettre par conséquent de mieux comprendre les mécanismes agissant lors de la sélection sexuelle chez cette espèce de papillon acoustique. En effet, il sera intéressant de voir si c'est la sélection imposée par les femelles lors du choix du partenaire qui va amener à une certaine adaptation des mâles qui vont alors modifier leur chant, ou si c'est plutôt des contraintes physiques qui vont être à l'origine d'une modulation du signal mâle. L'article qui suit résumera et commentera les différentes expériences et les résultats observés qui en ont découlés.

Article 1

Evaluation of amplitude in male song: female waxmoths respond to fortissimo notes

Limousin, D. and Greenfield, M. D. (2009)

The Journal of Experimental Biology 212, 4091-4100

Abstract

Female evaluation of male signals in the context of sexual selection is often made on the basis of signal energy. Particularly in acoustic species, females may prefer male song that is broadcast at greater amplitude or power. However, song amplitude may be represented by various parameters, and the specific one(s) that are evaluated are not clear. We addressed this problem in an acoustic moth, *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae), where males attract females with trains of paired ultrasonic pulses. Previous studies showed that females prefer songs that include pulse pairs that have greater mean peak amplitude and that are delivered with greater power (= mean peak amplitude X pulse-pair rate). Here, we report that given male songs of equal acoustic power, females prefer songs in which some pulses attain peak amplitudes that exceed the mean value and that this preference depends largely on the magnitude of amplitude fluctuation. We measured significant variation among males in their degree of amplitude fluctuation, and we note that males that broadcast with lower acoustic power typically show greater relative fluctuations and attain relatively higher amplitude maxima. We discuss the potential role of multiple integration time constants in female evaluation of mean song amplitude and amplitude maxima. We then consider the possibility that the variation observed in the male population is a response to female choice, but we also indicate that mechanical factors constraining song production may be responsible for such variation.

Introduction

The general female preference for and orientation toward male advertisements broadcast at high signal intensity is well known in the contexts of neuroethology and sexual selection (Andersson, 1994; Bradbury and Vehrencamp, 1998). Minimum thresholds of signal intensity that are necessary for evoking a neural or behavioral response in females normally exist. Moreover, females often exhibit higher levels of response as signal intensity increases, and they may display a distinct behavioral preference for the more intense of several signals (Kirkpatrick and Ryan, 1991; Ryan and Keddy-Hector, 1992). These generalizations are derived from laboratory and field studies of signaling in acoustic, vibrational and visual modalities, and they may represent a universal phenomenon (Greenfield, 2002). At a

neuroethological level, increased responses to more intense signals may simply reflect that higher stimulus energy evokes an increased likelihood of messages from sensory neurons and a greater rate of action potentials in those messages (Ewert, 1980). From the perspective of sexual selection, females exhibiting such graded responses may obtain genetic or material benefits by virtue of mating with a male that can or does expend greater energy on his advertisements (Lande, 1981; Pomiankowski, 1988; Kokko et al., 2002). This fundamental response to signal intensity, however, can mask some critical details in the processing that females use to evaluate signals and how such evaluations might have shaped the evolution of male signaling efforts. Specifically, signal intensity normally fluctuates over different temporal scales, and it is not clear how females process and evaluate intensity given such fluctuations.

Neurophysiologists have addressed one aspect of this problem through investigations of ‘integration time constants’ in perception. For example, acoustic species, particularly among insects and anurans, may integrate the sound energy that has arrived over a brief time interval (Tougaard, 1996; Tougaard, 1999; Ronacher et al., 2000; Gerhardt and Huber, 2002; Wyttenbach and Farris, 2004). This interval extends backward from the present time to a given moment in the past, and it is thus continually updated. The animal then processes a running integral of acoustic energy (sound amplitude summated over time) and can therefore detect and evaluate short pulses of sound and brief silent gaps, as well as other features, in longer broadcasts of song (e.g. Schiolten et al., 1981; Hennig et al., 2004). But depending on the parameters of the integration time constant, the animal may also fail to detect shorter pulses and briefer gaps.

Despite the above studies on neuroethological function, relatively few behavioral studies have probed the manner in which time constants might influence the various processes of sexual selection. That is, we have very little information on the specific way in which females respond to the amplitude of male song. Do females simply assess overall mean amplitude levels and orient toward songs with the highest mean values, or are females unduly influenced by occasional maximum values that greatly exceed the mean? And, do the amplitude properties of male song show evidence of selection pressure imposed by the specific protocol of female assessment? We addressed the question of female evaluation of amplitude in male song in an acoustic moth, *Achroia grisella* Fabricius (lesser waxmoth; Lepidoptera: Pyralidae: Galleriinae). Male *A. grisella* attract females with a calling song that consists of a continuous train of ultrasonic pulses (Spangler et al., 1984). The males produce their song for 6–10 h

each night until death while remaining stationary on the substrate and fanning their wings at 35–50 cycles per second (measured at 25°C). This activity causes a pair of small tymbal structures situated at the base of each forewing to resonate, once on the upstroke of the wings and once on the downstroke. Each resonance yields an 80–130 μ s pulse of sound consisting of frequencies from 70–130 kHz. The pulses are relatively intense [peak amplitude = 90–95 dB SPL (sound pressure level) at 1 cm; 0 dB SPL = 20 μ Pa], and their envelope shows a characteristic sudden rise and exponential decay. Because the left and right tymbals do not resonate in perfect synchrony, two pulses, separated by a brief ‘asynchrony interval’, are normally produced during both the upstrokes and downstrokes of the wings. Thus, a wing-fanning male generates pulse pairs and does so at 70–100 pulse pairs s^{-1} , twice the rate of cycles of wing movement. Peak amplitude of the sound pulses typically fluctuates by several decibels between pulse pairs and between the two pulses within a pair.

Female *A. grisella* normally run, rather than fly, toward singing males, and they may exhibit such phonotaxis over a distance up to 1 m (Greenfield and Coffelt, 1983). Playback experiments in which females were attracted to loudspeaker broadcasts of digitized song recordings indicate that phonotaxis thresholds may be as low as 50–60 dB SPL [peak amplitude (Brandt et al., 2005) and unpublished data]. Studies of several *A. grisella* populations showed that females prefer male songs with pulses of greater peak amplitude that are delivered at a faster rhythm, and that include longer asynchrony intervals within the pulse pairs (Jang and Greenfield, 1996; Jang and Greenfield, 1998). A major portion of female evaluation of male song may be based on acoustic power, defined here as the product of mean peak amplitude and pulse pair rate: playback experiments using synthetic signals suggested that females were equally attracted to songs with low peak amplitude pulses delivered at a rapid pulse pair rate and to songs with high peak amplitude pulses delivered at a slow pulse pair rate, with acoustic power held constant in both songs (Greig and Greenfield, 2004).

The above experiments, however, were conducted in the absence of the fluctuations in peak amplitude that occur naturally in *A. grisella* male song. Given these natural fluctuations and our incomplete understanding of amplitude evaluation in this species, we asked whether females show a strict adherence to preference for song based on acoustic power or whether they prefer songs that fluctuate and include some pulses that attain maximum amplitudes considerably higher than the mean. We report that females prefer the latter and that this preference is influenced by an integration time constant that may last for approximately 10 ms, one pulse-pair period. In turn, we note that some males do exhibit marked fluctuations in

their amplitudes, and it remains possible that this feature represents a response to selection pressure imposed by female choice.

Materials and Methods

Population studied and measurement of acoustic parameters

We studied *A. grisella* from a laboratory population derived from several hundred individuals collected in Indre et Loire, France in October 2007. The moths were reared on a standard diet containing wheat, corn and rye flours, water, glycerol, nutritional yeast, honey and beeswax [modified from Dutky et al. (Dutky et al., 1962)]. Both larvae and adults were kept in an environmental chamber at $26\pm1^{\circ}\text{C}$ and a 12:12 L:D photoperiod. Generation duration, measured from oviposition to oviposition, lasted 40–45 days under these conditions.

Our test insects were sampled from the population during the pupal stage and kept individually in 30-ml plastic cups to ensure that the eclosing adults experienced a standard social environment. This measure was particularly essential for the females, who usually mate but once and become sexually unreceptive thereafter. We conducted all tests of female responses and recordings of male song during the initial 6 h of the photoperiodic night, the diel interval during which mating activities in *A. grisella* are maximum. Because *A. grisella* adults neither feed nor drink and do not survive long (5–7 days for females and 7–14 days for males), we only tested adults within 30 h of their eclosion to avoid measuring senescing individuals.

We sampled the mating songs of 25 males to obtain a standard song representative of the population. Males were kept in small screen cages (1.5 cm diameter, 2.0 cm height) placed in an acoustically insulated chamber that was maintained under environmental conditions identical to those during rearing except that diffuse red light (25 W, incandescent) provided illumination. Earlier recordings confirmed that males sing normally in these cages and that the screen does not modify the acoustic parameters of the song (Jang et al., 1997). We placed a barrier of acoustic insulation foam between neighboring males and separated them by 30 cm to ensure that a male's song was not influenced by acoustic interactions with neighbors (see Jia et al., 2001). This measure also permitted clear recordings of a focal male without neighbors' songs in the background. We allowed the males a minimum of 15 min

acclimatization in the chamber prior to recording. We used a condenser ultrasound microphone (model CM16/CMPA; Avisoft Bioacoustics; Berlin, Germany; frequency response: ± 3 dB, 20–150 kHz), positioned 20 cm from the male and oriented toward him to record his song. The microphone output was digitized with an analogue/digital converter (model UltraSoundGate 416–200; Avisoft Bioacoustics) at 16 bits and 500,000 samples s^{-1} , and we saved a 30-s sample of this digitized song to a file on a personal computer using signal processing software (BatSound Pro 4.0; Pettersson Elektronik AB; Uppsala, Sweden).

From the file saved from each of the 25 sampled males we randomly selected a 1-s segment in the middle of the recording for analysis of acoustic parameters. Our only criterion was that the 1-s segment did not include brief silent gaps that reflected missing pulse pairs in an otherwise continuous train. We determined the repetition rate of pulse pairs (PR) for the entire segment and then randomly selected 20 consecutive pulse-pair periods for computing the asynchrony intervals (AI), measured from the onset of the first pulse to the onset of the second pulse of a pair. Because the repetition of pulse pairs includes an alternating succession of longer and shorter periods as well as an alternating succession of longer and shorter AIs, we measured the average ratio of the longer to shorter periods. We also measured the average of the longer and shorter AIs. Finally, we note that peak amplitude (PA) often fluctuates regularly between the two pulses of a pulse pair and also between successive pulse pairs. Thus, we measured PA, in arbitrary linear units, of each pulse in the 20 consecutive periods and thereby determined mean PA values for each of four consecutive pulses (two consecutive pulse pairs; see **Figure 3**). We then used these several measures, calculated with BatSound Pro 4.0, to create a standard signal the temporal and energy features of which represented the average values for male song in the population. This standard signal had a PR = 80 pulse pairs s^{-1} , a period ratio = 1.405 (longer: shorter period), longer and shorter AIs = 554 and 530 μs , respectively, and relative PAs that fluctuated successively from 1.00 to 1.23, 1.17 and 1.09 among the four pulses that constituted two consecutive pulse pairs (**Figure 3**).

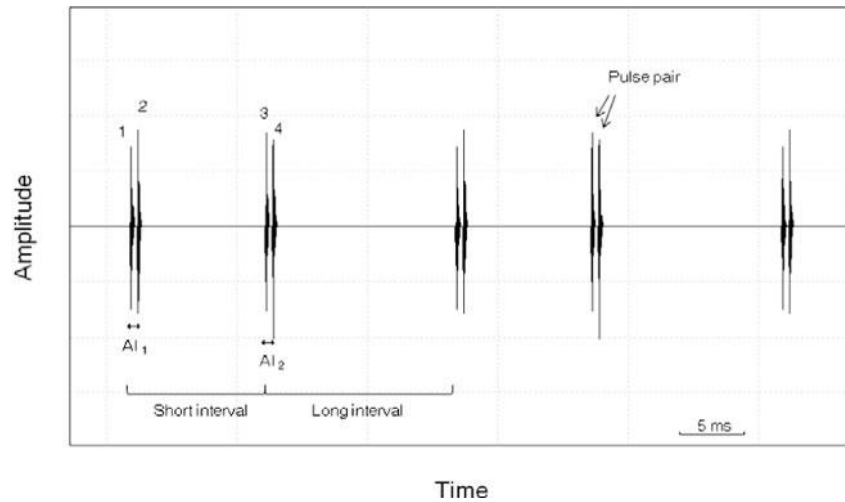


Figure 3: Oscillogram of four consecutive pulse-pair periods of the standard male signal used for testing female preference. The standard signal represents average temporal and energy values measured in the population; these values include: short pulse-pair period=10.4 ms; long pulse-pair period=14.6 ms; long asynchrony interval ($AI_1=554 \mu s$); short asynchrony interval ($AI_2=530 \mu s$); peak amplitude of pulse 1=1.00 arbitrary linear units; peak amplitude of pulse 2=1.23; peak amplitude of pulse 3=1.17; peak amplitude of pulse 4=1.09. The four numbered pulses comprise two consecutive pulse pairs or two consecutive pulse-pair periods, which are repeated for the duration of a playback trial. All call models are generated from a single pulse; vertical displacements from the baseline on the oscillogram accurately reflect maximum and minimum amplitude values of a pulse and are not subject to aliasing or pixelization, which could bias the oscillogram toward depicting lower values.

Playback experiments

General procedure

All of our playback experiments used a basic choice protocol in which we released a female in the center of an 80-cm diameter screen arena and presented simultaneous broadcasts of synthetic male song stimuli from two loudspeakers situated just outside the arena and separated by an azimuth of 120° . The central axes of the loudspeakers were level with the female in the center of the arena, and each loudspeaker was oriented directly toward her. The female was given 120 s in which to orient and arrive within a 10-cm radius of a loudspeaker and remain in that sector for a minimum 10 s. For release, the female was placed within a small, covered cell depressed 1 cm below the surface of the arena center. The cover was then removed, the cell was raised such that its floor was level with the arena surface, and the playback stimuli were broadcast. The cell did not have sides, which could have hindered the female's movement or her perception of song stimuli. All playback tests were conducted in a second acoustically insulated chamber maintained under conditions similar to the chamber used for song recording. Females were brought to the chamber at least 30 min prior to testing,

and they were held in an acoustically insulated box, isolated from males and synthetic male song, at all times except during its playback tests.

We created our playback stimuli from a single male pulse, recorded at 16 bits and 500,000 samples s^{-1} as described above, that had an envelope and spectral properties average for the population. Using BatSound 4.0, we digitally repeated this pulse at precise intervals and with precise adjustments in relative amplitude in order to fashion the standard signal on one channel of a 30-s stereo sound file. The standard signal was then copied to the other channel and its relative peak amplitudes were modified appropriately. During a playback test we continuously looped the stereo file on a personal computer, converted the digital signal to analog with an input/output card (DAQcard 6062E; National Instruments; Austin, Texas, USA), and sent the analog signals at 214,285 samples s^{-1} to the two loudspeakers (model ScanSpeak; Avisoft Bioacoustics; frequency response: ± 2 dB, 60–120 kHz), each amplified by a multi-channel power amplifier (Avisoft Bioacoustics).

In all experiments we adjusted the peak amplitude, as presented at the location of the female in the arena center, of the loudest pulse of the standard signal to 75 dB peSPL (peak equivalent sound pressure level; 0 dB=20 μ Pa). Thus, the other pulses were 73.2 (pulse 1), 74.6 (pulse 3), and 74.0 dB peSPL (pulse 4; see **Figure 3**). Adjustment was made with the aid of a sound pressure level meter (model CEL-430/2; Casella, Kempston, UK; flat frequency response from 30–20,000 Hz), confirmed with a calibrator (model CEL-110/2; Casella). We implemented the method of peak equivalents by relating the millivolt output of a continuous 20 kHz broadcast, as measured by the condenser ultrasound microphone, to the SPL of this broadcast, as registered by the SPL meter. We then noted the millivolt output of the synthetic song stimulus broadcast as measured by the microphone, and we adjusted the gain on the loudspeaker amplifier until this millivolt output was equivalent to 75 dB peSPL (see Jang and Greenfield, 1996). This peSPL value was roughly equivalent to the song of a male *A. grisella* 10 cm distant, and it was 6–10 dB higher than average thresholds observed for female orientation toward male song.

Amplitude discrimination

Our first experiment served to evaluate the basic degree at which females in the population discriminated amplitude levels of male song. We judged that this information was necessary before proceeding to the tests of fine-tuned assessment of amplitude fluctuation. We

conducted four different tests in which females were presented with playback of the standard signal *versus* a modified signal in which the peak amplitude of each pulse was either decremented or incremented by a given percentage: (1) decrement by 50% (–6 dB); (2) decrement by 75% (–12 dB); (3) increment by 50% (+3.5 dB); (4) increment by 100% (+6 dB) (see **Figure 4A** for depiction of the first test). The positions of the loudspeakers broadcasting the standard and modified stimuli were switched on successive tests to preclude a side bias from confounding our results. Individual females were tested once with each of the four tests, which were presented in random sequence with at least 30 min between successive tests to avoid habituation. Only data from females that responded to a song stimulus in each of the four tests were retained for analysis.

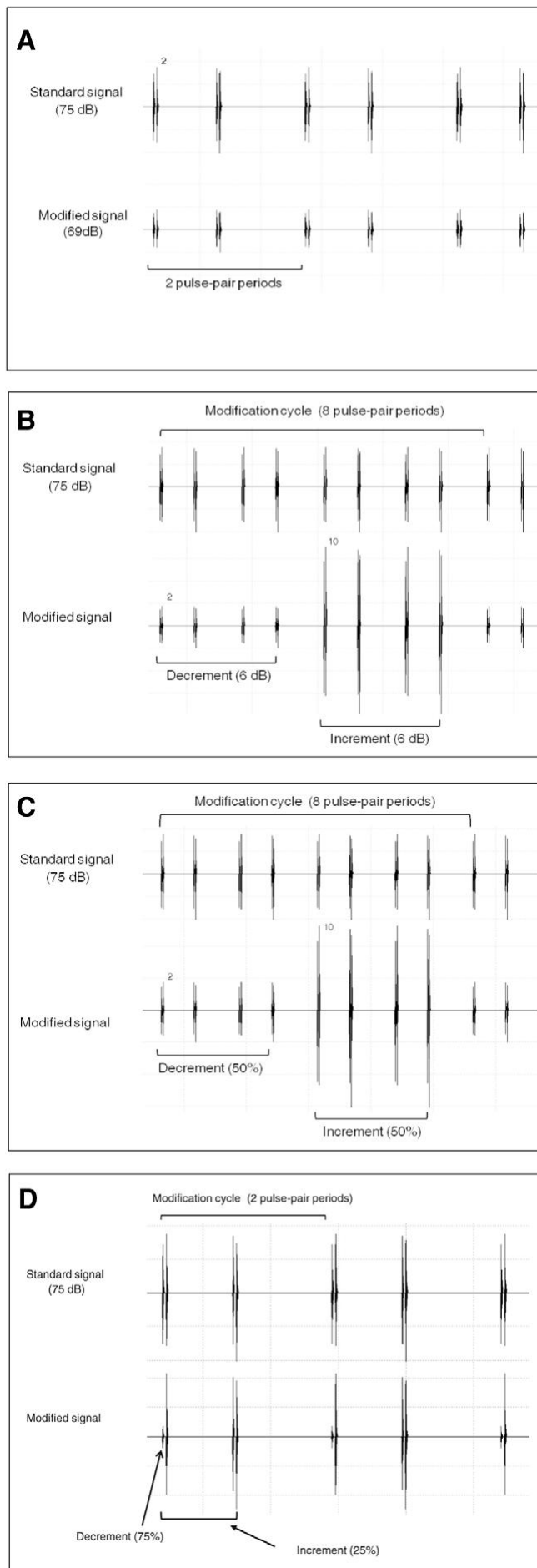


Figure 4: Oscillograms showing standard and modified signals presented in the four playback experiments. In each experiment the amplitude of the second, most intense pulse (2) of the standard signal (see **Figure 3**) is adjusted to 75 dB peSPL at the position of the tested female; the modified signal is created by adjusting the standard signal by specific decrements and increments in amplitude. (A) Experiment testing amplitude discrimination: modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitudes of each pulse are decremented by 6 dB, i.e. the second, most intense pulse is broadcast at 69 dB peSPL. (B) Experiment testing discrimination between fluctuating and standard song: the modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitudes of the pulses in the first half of the 8-period modification cycle are each decremented by 6 dB (50%) whereas the pulses in the second half of the modification cycle are each incremented by 6 dB (100%); i.e. the second (2) and tenth (10) pulses of the modified signal are broadcast at 69 and 81 dB peSPL, respectively. (C) Experiment testing discrimination between fluctuating and standard song: the modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitudes of the pulses in the first half of the 8-period modification cycle are each decremented by 50% (6 dB) whereas the pulses in the second half of the modification cycle are each incremented by 50% (3.5 dB), thereby preserving the same power as broadcast in the standard signal; i.e. the second (2) and tenth (10) pulses of the modified signal are broadcast at 69 and 78.5 dB peSPL, respectively. (D) Experiment testing discrimination between fluctuating and standard song at shorter time scales: modified signal in this example is adjusted such that the peak amplitude of the first of four pulses is decremented by 75% and the following three are incremented by 25%, thereby preserving the same power as broadcast in the standard signal. Vertical displacements from the baseline accurately depict maximum and minimum amplitude values of a pulse; see **Figure 3**.

Discrimination of constant versus fluctuating song

We began our study of discrimination of amplitude fluctuation by conducting an experiment that included six different tests in which we presented females with a choice of the standard signal *versus* a modified one in which peak amplitudes fluctuated over a greater range. The modification was effected over a cycle of either 16 pulse-pair periods (two tests), 8 pulse-pair periods (two tests), 4 pulse-pair periods (one test), or 2 pulse-pair periods (one test). In each case the pulses were decremented by a given amplitude, either 3 dB (two tests; modification cycles of 16 and 8 pulse-pair periods) or 6 dB (four tests; modification cycles of 16, 8, 4 and 2 pulse-pair periods), for half of the modification cycle and incremented by the same amount for the other half of the cycle (see **Figure 4B** for depiction of test presenting ± 6 dB with a modification cycle of 8 pulse-pair periods). These modification cycles were then repeated for the duration of the playback test. Thus, peak amplitudes of the loudest pulses of the standard signal were raised to either 78 or 81 dB peSPL in the incremented half of the modification cycle, and they were lowered to either 72 or 69 dB peSPL in the decremented half. The modified peSPLs of the three other pulses of the standard signal were adjusted accordingly, to levels slightly lower than the values noted above (cf. **Figure 3**).

Acoustic perception may normally scale logarithmically (see Wytenbach and Farris, 2004), and we made the above modifications to reflect the expectation that the difference between 75 dB peSPL and $75+x$ dB peSPL may be perceived as equivalent to the difference between 75 dB peSPL and $75-x$ dB peSPL. However, we note that when this procedure is used the acoustic power of the modified signal slightly exceeds the power of the standard signal. For example, when $x=6$ dB, the mean peak amplitude of the modified signal=0.1403 Pa, whereas the mean peak amplitude of the standard signal=0.1125 Pa. Thus, in a second experiment we repeated the above tests while broadcasting equivalent acoustic power in both standard and modified signals. As above, we conducted six different tests in which the modification was effected over a cycle of either 16 pulse-pair periods (two tests), 8 pulse-pair periods (two tests), 4 pulse-pair periods (one test), or 2 pulse-pair periods (one test). But here, the pulses were modified by a given amplitude differential measured along a linear scale, a 50% lowering (two tests; modification cycles of 16 and 8 pulse-pair periods) or a 75% lowering (four tests; modification cycles of 16, 8, 4 and 2 pulse-pair periods) in the decremented half of the modification cycle and a 50% or 75% raise in the incremented half (see **Figure 4C** for depiction of test presenting $\pm 50\%$ with a modification cycle of 8 pulse-pair periods). Expressed in terms of dB peSPL, signals with $\pm 50\%$ fluctuations were broadcast at 69 and

78.5 dB peSPL, whereas those with $\pm 75\%$ fluctuations were broadcast at 63 and 79.9 dB peSPL.

In a third experiment we examined whether females might discriminate among different degrees of amplitude fluctuation that occur at a finer temporal scale. We repeated the protocol of the above tests in which acoustic power was held constant in both signals except that here we incremented and decremented peak amplitudes of the modified signal within 2 pulse-pair periods (two consecutive pulse pairs). Four different tests were conducted in which we: (1) incremented the first of four pulses by 100% and decremented the following three pulses by 33%; (2) incremented the first of four pulses by 50% and decremented the following three pulses by 17%; (3) decremented the first of four pulses by 50% and incremented the following three pulses by 17%; (4) decremented the first of four pulses by 75% and incremented the following three pulses by 25% (**Figure 4D**). In each test the four-pulse modification cycle was repeated for the duration of the playback trial.

All three experiments evaluating female discrimination of constant *versus* fluctuating song included an additional, control test in which the two loudspeakers broadcast identical, standard signals. As in the experiment on basic amplitude discrimination, individual females were tested once with each of several different modified signals plus the control (see **Figure 5** for specific design). The several tests were presented to a female in random sequence with at least 30 min between successive tests. Once a female failed to move from the release point during a test in the sequence her data was eliminated from the analysis.

Measurement of natural fluctuation in peak amplitude of male song

We systematically analyzed male song from our population to evaluate whether maximum amplitude features showed any evidence of selection pressure imposed by specific female preferences. We sampled 30-s song recordings from 82 males using the procedure described above for determining the standard playback signal. First, we selected a 1-s segment from the recording of each individual and determined the repetition rate of pulse pairs (parameter 1). Then, from each 30-s recording we selected three segments, 16 pulse pairs in length and uninterrupted by silent gaps, from the beginning, middle, and final 10 s, for study using the ‘pulse train analysis’ and ‘root mean square’ (r.m.s.) functions in Avisoft SASlab Pro.

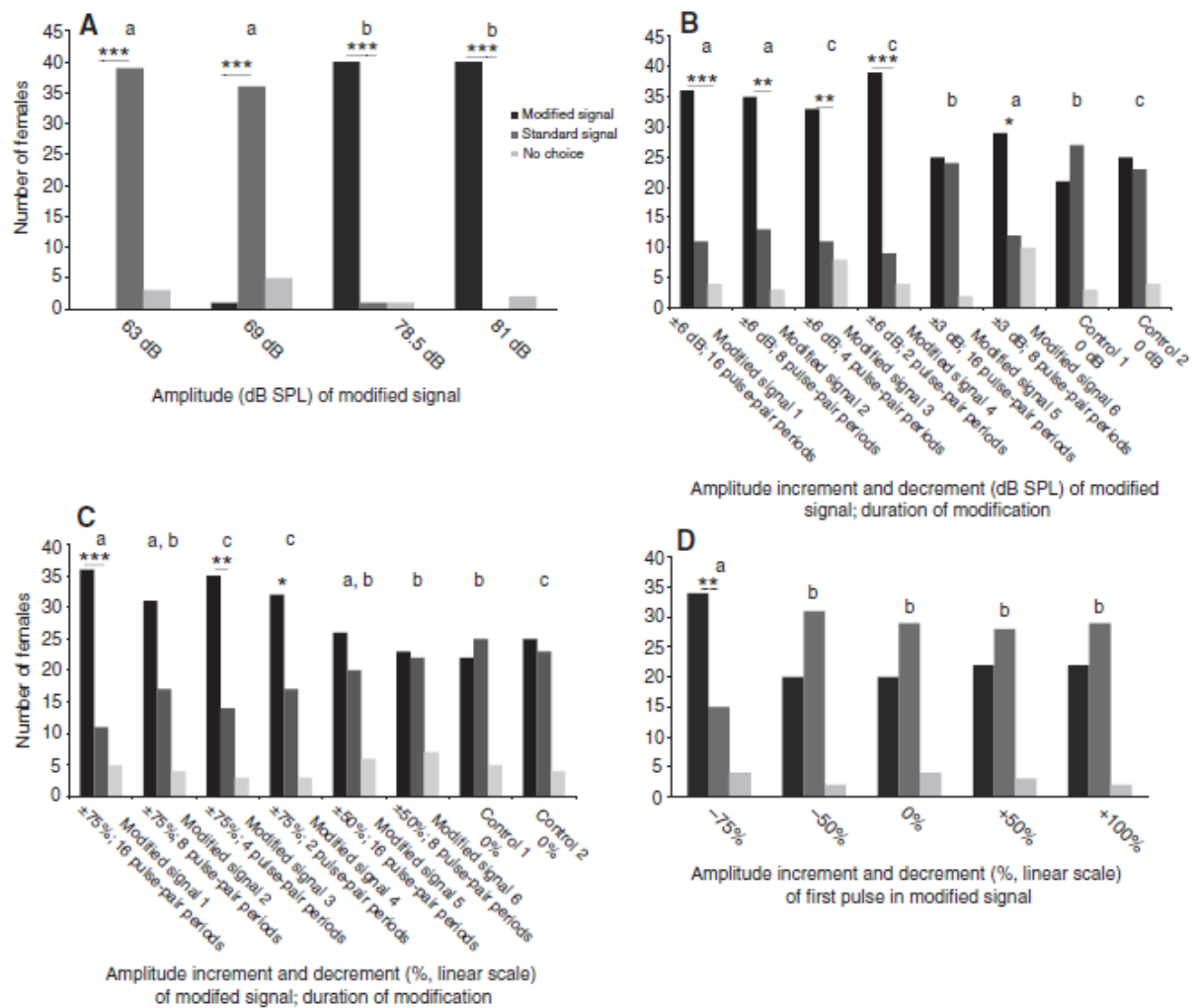


Figure 5: Female discrimination between standard and modified signals presented in the four playback experiments. In each experiment the dark, medium, and light vertical bars represent the numbers of females orienting toward the loudspeaker broadcasting the modified signal, the standard signal, or failing to orient to either loudspeaker, respectively. (A) Experiment testing amplitude discrimination between the standard signal (75 dB peSPL) and the modified signal (peak amplitude of second, most intense pulse is indicated along x-axis). (B) Experiment testing discrimination between standard and fluctuating song (magnitude and modification cycle of fluctuation indicated along x-axis). (C) Experiment testing discrimination between standard and fluctuating song where power is conserved in both songs (magnitude and modification cycle of fluctuation indicated along x-axis). (D) Experiment testing discrimination between standard and fluctuating song at shorter time scales (amplitude decrement or increment of first pulse in fluctuating song is indicated along x-axis; the following three pulses were incremented or decremented accordingly to conserve the power broadcast in the standard song; see text). * $P < 0.05$, two-tailed binomial test; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; underlined asterisks indicate $P < 0.05$ following Holm correction for multiple tests (Holm, 1979). Within each of the four experiments, modified signals with the same letters above the vertical bars do not have significantly different levels of discrimination; $P > 0.05$, McNemar's test for comparison of dependent proportions (Zar, 1999). In A and D, an individual female was tested with all four modified signals and the control. In B and C, an individual female was tested with either modified signals 1, 2, 5 and 6 and control 1 (five tests) or with modified signals 3 and 4 and control 2 (three tests).

In addition to the song recordings, we weighed each male to the nearest 0.01 mg on the day of adult eclosion.

From each 16-pulse-pair segment we determined the following energy parameters: (2) mean peak amplitude, measured in Pa, of pulse pairs; i.e. mean peak amplitude of the louder pulse of each pulse pair; (3) mean r.m.s. amplitude, measured in Pa, of pulse pairs; i.e. mean r.m.s. amplitude of the louder pulse of each pulse pair; (4) acoustic power, as measured by the repetition rate of pulse pairs multiplied by the mean peak amplitude of pulse pairs; i.e. parameter 1_{parameter 2}; (5) acoustic power, as measured by the repetition rate of pulse pairs multiplied by the mean r.m.s. amplitude of pulse pairs; i.e. parameter 1_{Xparameter 3}. We also determined the following parameters of amplitude fluctuation: (6) coefficient of variation (=standard deviation/mean) of peak amplitudes of pulse pairs; (7) coefficient of variation of r.m.s. amplitudes of pulse pairs; (8) standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of the pulse pairs [= (peak amplitude of the pulse pair having the maximum value–peak amplitude of the pulse pair having the minimum value)/mean peak amplitude of pulse pairs]; (9) standardized difference between maximum and minimum r.m.s. amplitudes of the pulse pairs [= (r.m.s. amplitude of the pulse pair having the maximum value–r.m.s. amplitude of the pulse pair having the minimum value)/mean r.m.s. amplitude of pulse pairs]. For each of these eight parameters, we averaged the three values determined from an individual to estimate his mean level.

To evaluate whether any correlations existed between temporal or energy parameters (1–5) and parameters measuring levels of amplitude fluctuation (6–9), we determined the Spearman rank correlation coefficient between individual mean levels of each parameter in the first set *versus* individual mean levels of each parameter in the second set. This non-parametric statistic was measured because most of the parameters were not normally distributed. Thus, we considered the hypotheses (1) that males who sustained a relatively high pulse-pair rate, acoustic power, or mean peak or r.m.s. amplitude level in their song also produced peak or r.m.s. amplitude maxima, and an alternative (2) that males with relatively low pulse-pair rate, peak or r.m.s. amplitude, or acoustic power compensated for their inferior song by producing peak or r.m.s. amplitude maxima.

Results

The experiment on amplitude discrimination showed that females in our population clearly preferred higher SPL levels of male song and that this preference remained very strong for a 3.5 dB difference (75 vs 78.5 dB peSPL; **Figure 5A**; two-tailed binomial test, $P < 0.001$). Based on these findings, we proceeded to the next experiments in which we tested female discrimination of song with constant vs fluctuating SPL.

Overall, our study of discrimination of constant (standard signal) vs fluctuating SPL (modified signal) showed that females preferred fluctuating male songs, wherein some pulses attain greater peak amplitude. The first of the three experiments in this study demonstrated that females clearly preferred song with 6-dB amplitude fluctuations (69 and 81 dB peSPL) over songs of constant amplitude (75 dB peSPL; **Figure 5B**; two-tailed binomial test, $P < 0.01$), but that the preference was much weaker when 3-dB amplitude fluctuations were tested. In the latter case, the preference for fluctuating song was seen only when an 8-period modification cycle was used ($P < 0.05$). On the whole, the magnitude of the fluctuations influences female preference more strongly than the length of the modification cycle does: highly significant preferences were observed in four of four tests with 6-dB fluctuations, whereas only weak significance was observed in one of two tests with 3 dB fluctuations. However, highly significant preference was observed in one of two tests with 16-period modification cycles, in one of two tests with 8-period cycles, and in the tests with 4-period and 2-period cycles; we observed a weak preference in the second test with 8-period cycles.

In the second experiment, where acoustic power was held constant, we found some female preference for fluctuating vs constant song but at a reduced level in comparison with the experiment above. Females showed a significant preference for the fluctuating song only in the tests where the modified signal included fluctuations of $\pm 75\%$ over a 16-period, 4-period, or 2-period modification cycle (**Figure 5C**; two-tailed binomial test, $P < 0.05$). To facilitate comparison with the experiment above, we note that this modified signal eliciting preference included pulses with peak amplitudes of 63 and 79.9 dB peSPL. Again, we note that fluctuation magnitude influences female preference more strongly than the length of the modification cycle does: we observed a highly significant preference in two of four tests with 75% fluctuations and a weak preference in a third test, whereas we observed no preferences in tests with 50% fluctuations. However, we observed a highly significant preference in one of two tests with 16-period modification cycles, a statistically similar preference (McNemar's

test for comparison of dependent proportions, $P>0.05$) in one of two tests with 8-period cycles, and significant preferences in the tests with 4-period and 2-period cycles.

The third experiment, in which we tested discrimination over a shorter time interval, showed that females preferred the fluctuating song only when peak amplitude of the first of four pulses was decremented 75%, with the following three incremented 25% (**Figure 5D**; two-tailed binomial test, $P<0.01$). Otherwise, significant preferences for constant or fluctuating song were not observed, although we note that here a greater number of females oriented toward the constant song.

Our analyses of male song in the sampled population show that certain individuals produce fluctuations in amplitude that greatly exceed the relatively modest fluctuations included in the standard signal (**Figure 6**).

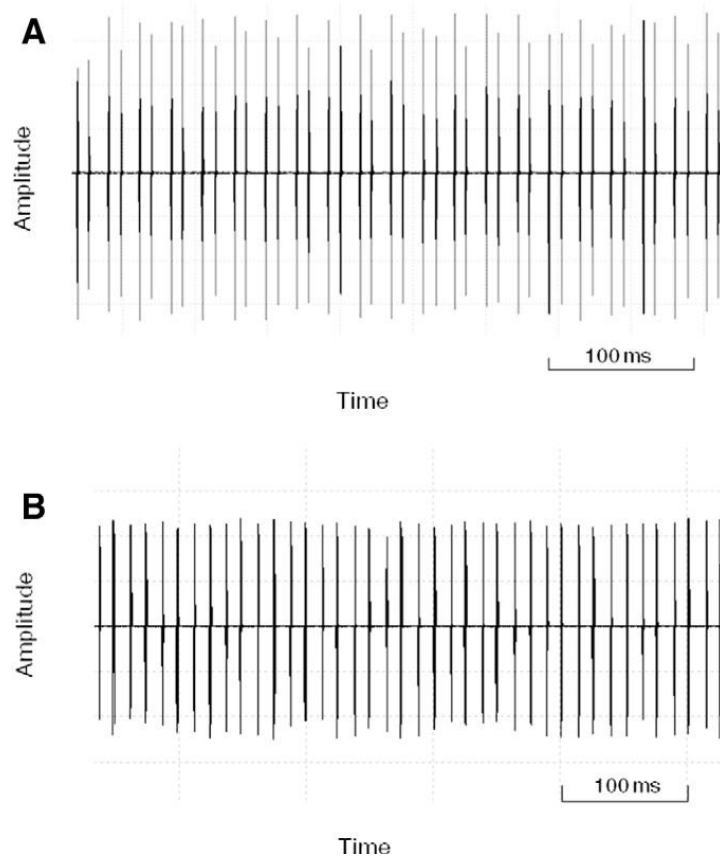


Figure 6: Oscillograms showing two representative males singing (A) with marked amplitude fluctuations between successive pulse pairs and (B) at relatively constant amplitude. In both A and B, each apparent pulse actually represents a pulse pair (see **Figure 3**). Vertical displacements from the baseline accurately depict maximum and minimum amplitude values of a pulse pair; see **Figure 3**.

We observed that approximately 25% of the sampled population had a coefficient of variation for peak amplitude of pulse pairs (parameter 6) greater than 0.13: four times the coefficient of variation measured in the standard signal (**Figure 7A**), and 70% of the sampled population had a standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of pulse pairs (parameter 8) greater than 0.19, four times the index measured in the standard signal (**Figure 7C**). Moreover, when r.m.s. amplitudes were measured, we found that 56% of the sampled population had a coefficient of variation (parameter 7) greater than 0.40, a level equivalent to that in the ± 3 dB modified signal (**Figure 7B**), and 65% of the sampled population had a standardized difference between maximum and minimum amplitude (parameter 9) greater than 1.1, a level equivalent to that in the ± 6 dB modified signal (**Figure 7D**). Overall, peak and r.m.s. amplitudes of pulse pairs were significantly correlated ($r=0.88$, Spearman rank correlation, $P<0.01$).

We found significant negative correlations between measures of signal energy (parameters 2–5) and the coefficient of variation of amplitude of pulse pairs (peak value; parameter 6) and the standardized index of maximum–minimum difference (peak value; parameter 8; **Tableau 1, Figure 8**). In general, body mass was not correlated with the parameters of song energy or of fluctuation in song energy. We observed a single (negative) correlation between mass and the coefficient of variation of maximum amplitude of pulse pairs (peak value; parameter 7; **Tableau 1**).

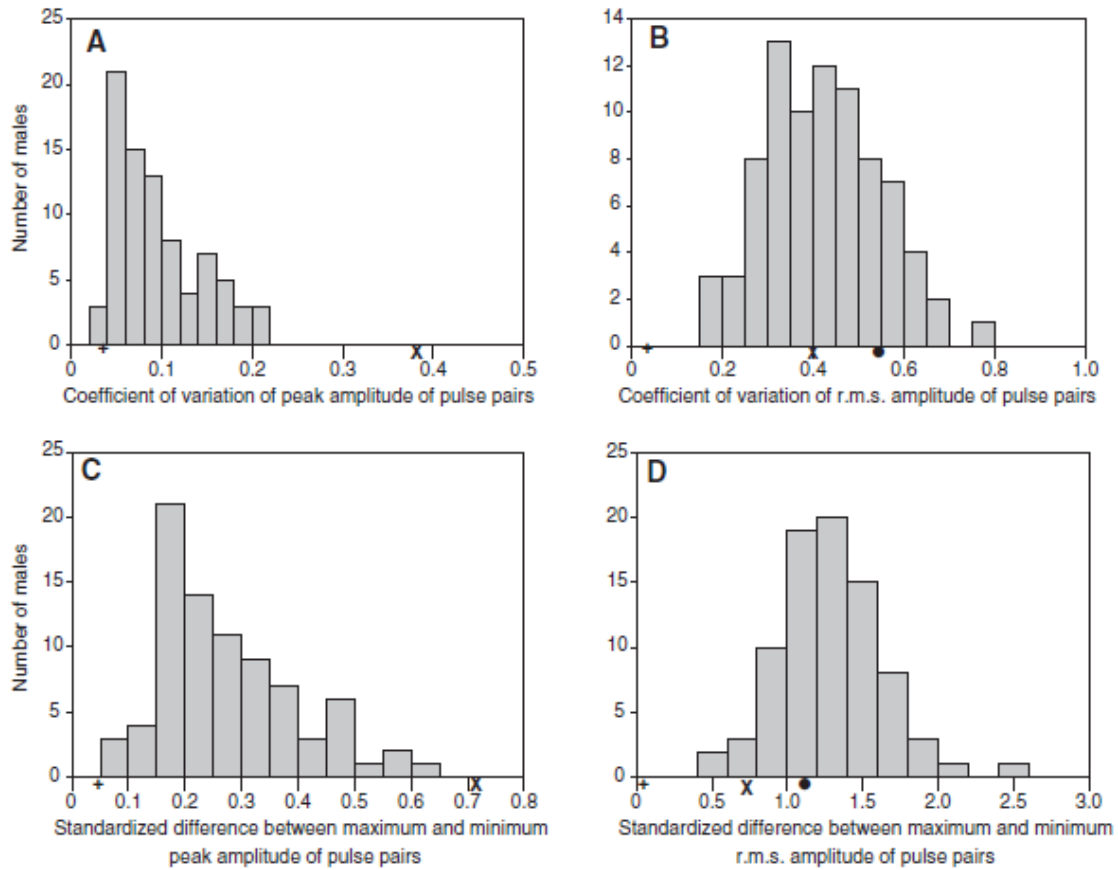


Figure 7: Indices of amplitude fluctuation observed among 82 males sampled from the laboratory population. (A) Coefficient of variation of peak amplitude of pulse pairs (parameter 6). (B) Coefficient of variation of root mean squares (r.m.s.) amplitude of pulse pairs (parameter 7). (C) Standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of pulse pairs (parameter 8). (D) Standardized difference between maximum and minimum r.m.s. amplitude of pulse pairs (parameter 9). See text for definitions of parameters. +, value of index in standard signal; X, value of index in ± 3 dB modified signal; •, value of index in ± 6 dB modified signal.

	Mean amplitude of pulse pairs			Acoustic power		Mass
	Pulse pair rate (parameter 1)	Peak value (parameter 2)	r.m.s. value (parameter 3)	(parameters 1×2 =parameter 4)	(parameters 1×3 =parameter 5)	
Coefficient of variation of peak amplitude of pulse pairs (parameter 6)	0.0807 (0.470)	−0.351 (0.00129)*	−0.359 (0.00)*	−0.299 (0.00643)*	−0.312 (0.00443)*	−0.318 (0.00372)*
Coefficient of variation of r.m.s. amplitude of pulse pairs (parameter 7)	0.0118 (0.916)	0.164 (0.140)	−0.166 (0.136)	0.171 (0.124)	−0.130 (0.244)	−0.0461 (0.680)
Standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of pulse pairs (parameter 8)	0.121 (0.278)	−0.359 (0.00)*	−0.324 (0.00)*	−0.296 (0.00711)*	−0.268 (0.0149)*	−0.211 (0.0568)
Standardized difference between maximum and minimum r.m.s. amplitude of pulse pairs (parameter 9)	−0.0193 (0.863)	0.197 (0.0764)	−0.135 (0.226)	0.180 (0.105)	−0.118 (0.291)	−0.0539 (0.630)
Mass	0.0435 (0.697)	−0.00702 (0.950)	0.117 (0.296)	−0.00692 (0.951)	−0.0886 (0.428)	
Correlations between male body mass, measured on the day of adult eclosion, and parameters of song energy and parameters of amplitude fluctuation are also shown (row 5 and column 6, respectively). r.m.s., root mean squares. P-values of correlation coefficients are shown in parentheses; *P-value <0.05 following Holm adjustment for multiple tests.						

Tableau 1: Spearman rank correlations between parameters of amplitude fluctuation (rows 1–4) and parameters of temporal and song energy (columns 1–5) as determined from measurements of 82 males.

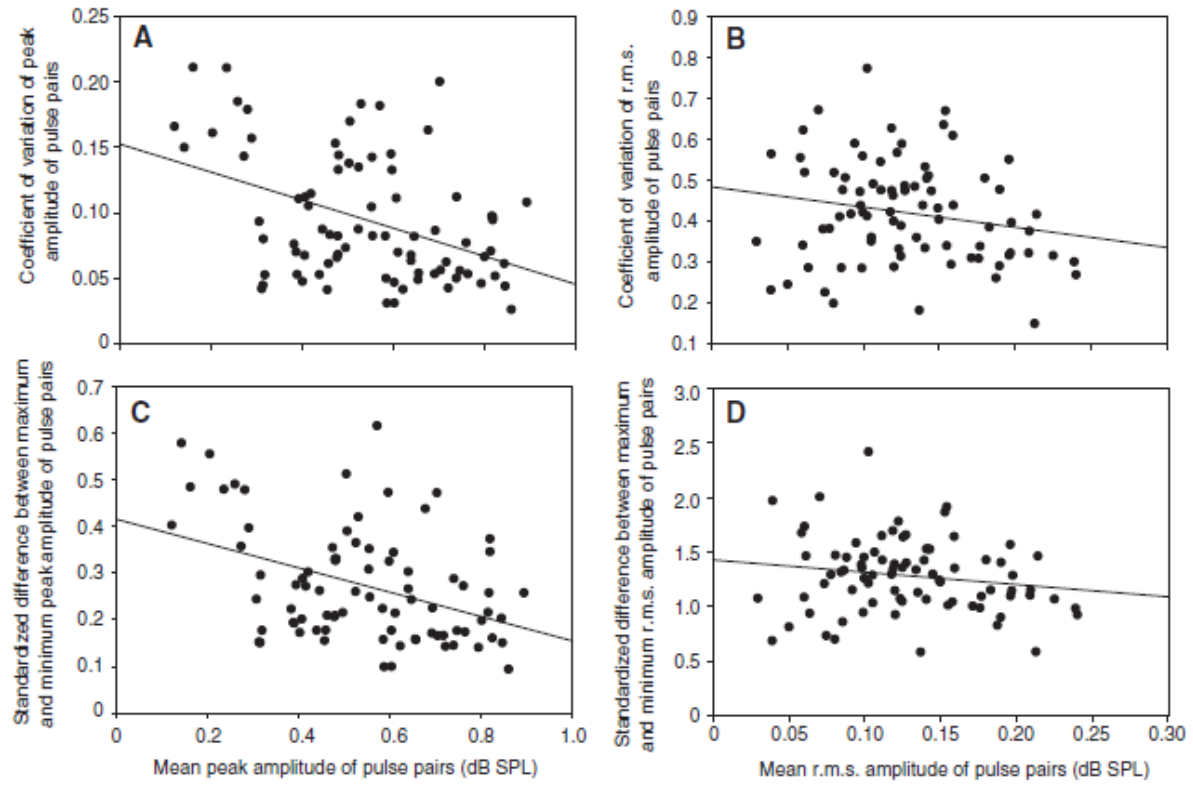


Figure 8: (A) Coefficient of variation of peak amplitude of pulse pairs versus mean peak amplitude of pulse pairs. (B) Coefficient of variation of root mean squares (r.m.s.) amplitude of pulse pairs versus mean r.m.s. amplitude of pulse pairs. (C) Standardized difference between maximum and minimum peak amplitude of pulse pairs (see text) versus mean peak amplitude of pulse pairs. (D) Standardized difference between maximum and minimum r.m.s. amplitude of pulse pairs versus mean r.m.s. amplitude of pulse pairs. Data points represent 82 males sampled from the laboratory population. See **Tableau 1** for correlation statistics.

Discussion

Findings from our playback experiments show that female *A. grisella* discriminate finely between male signals that differ in mean peak amplitude, and that they also discriminate between male signals broadcast at the same mean peak amplitude but that differ in the extent to which peak amplitude varies over the course of a song. Females clearly prefer the higher of two signals differing by as little as 3.5 dB in peSPL, which is consistent with previous findings – obtained from a different *A. grisella* population – that some discrimination even occurs for amplitude differentials of 2 dB peSPL (Jang and Greenfield, 1996). When given male signals in which mean peak amplitude is held constant, females also prefer those signals that exhibit marked fluctuations in peak amplitude over those that remain relatively constant (**Figure 5**). This preference is more pronounced where the standard signal (75 dB peSPL; 0.1125 Pa) is incremented and decremented by x dB than where the increments and decrements are represented by $x\%$, measured on a linear scale; i.e. 0.1125 Pa $\pm x\%$. Nonetheless, the preference for fluctuating signals does remain in the latter case, wherein a mean peak amplitude of 0.1125 Pa was preserved in both standard and fluctuating signals. In both cases we note that the magnitude of the fluctuations exerts a stronger influence on female preference than the length of the modification cycle does.

We observed that a substantial proportion of the sampled male population exhibits a much higher level of variation in amplitude of pulse pairs than that represented by the standard signal. This variation is more striking for measures of variation based on r.m.s. values (parameters 7 and 9) than on peak values (parameters 6 and 8; **Figure 7**). Consistent with one initial expectation, we found that the males exhibiting greater fluctuations in peak amplitude of pulse pairs were generally those individuals broadcasting at lower mean peak amplitudes of pulse pairs (**Figure 8**). Behavioral responses to fluctuating versus standard signals may be influenced by sensitivity thresholds, and we analyze the preferences for fluctuating signals noted above to discern whether they might represent artifacts of such thresholds. That is, average sensitivity thresholds in the population for female orientation toward male song range from 65–70 dB peSPL (unpublished data), which implies that some tested females had higher threshold values. Presented with a fluctuating song, e.g. 75 ± 6 dB peSPL or 0.1125 Pa $\pm 75\%$, these latter females would have perceived a slower pulse-pair rate, as some pulse pairs would have fallen below their threshold. But female *A. grisella* are expected to reduce their response as pulse-pair rate slows (Jang and Greenfield, 1996; Greig and Greenfield, 2004), indicating

that this potential artifact did not confound the result that fluctuating signals are more attractive than the standard. Similarly, we consider the possibility that sensory adaptation to maximum peak amplitudes might have interfered with our tests of female discrimination between standard and fluctuating song. Here, females might adapt to the peak amplitude level of incremented pulse pairs in fluctuating song (PA_{inc} dB peSPL) and thereby ignore the decremented ones because these weaker pulse pairs fail to attain the insect's sliding threshold (amplitude within y dB of the maximum stimulus level) for response, i.e. decremented pulse pairs do not exceed $(PA_{inc}-y)$ dB peSPL. But again, females subject to adaptation would be expected to perceive a slower pulse-pair rate and reduce, rather than increase, their response to fluctuating song.

Previous tests (Greig and Greenfield, 2004) have shown that *A. grisella* females evaluate acoustic power (pulse-pair rate multiplied by mean peak amplitude) of male song. Our present findings do not contradict this but rather indicate that additional song features are evaluated. Given songs of equivalent acoustic power, female *A. grisella* appear to evaluate the maximum amplitudes that are attained during the course of a song and then orient preferentially toward the song with higher maxima; at present, we cannot distinguish whether this evaluation is based on peak or r.m.s. values of the maxima. One interpretation of this refinement is that song is evaluated by several processing mechanisms that operate simultaneously, each triggered by a different threshold amplitude level or summated over a different time constant (see Tougaard, 1998). Possibly, the trigger level of one processor is set rather high, such that it is only released by pulse pairs with peak or r.m.s. amplitudes that greatly exceeds the mean. We note that *A. grisella* have only four receptor neurons in each tympanum (Knopek and Hintze-Podufal, 1986), but we also note that each of these neurons could have different sensitivities (cf. Roeder, 1967). Thus, the hypothetical processors that are released by different trigger levels might be represented by the several receptor neurons. Subsequent to this peripheral neural processing, overall song evaluation would then occur via central processing of these several sensory inputs.

The various results of our three experiments testing female discrimination of standard versus fluctuating songs suggest that the time constant for evaluating amplitude maxima is approximately 10 ms, one pulse-pair period in length. We observed that modification cycles as short as of 2 pulse-pair periods in length elicited preferences for fluctuating song (**Figures 5B,C**), whereas modifications made within a single pulse-pair generally did not (**Figure 5D**). That is, females appeared to respond to maxima that lasted for 1 to 8 pulse pairs but not to

shorter maxima. Females did not respond preferentially to fluctuating songs in which a single pulse was incremented followed by three slightly decremented pulses, and they showed only a weak preference for fluctuating songs in which a single pulse was decremented followed by three slightly incremented pulses. This latter finding suggests that amplitude maxima may be evaluated primarily at the level of the pulse pair rather than the individual pulse: in this test (**Figure 5D**), females may have perceived two consecutive pulse pairs the peak amplitudes of which were each incremented by 25% (2 dB) because they were relatively uninfluenced by the weaker pulse of a pulse pair.

Does female preference for fluctuating song merely reflect the outcome of physiological mechanisms of signal processing, or do females also profit from orienting toward these songs and from mating with males who produce them? Our data do not directly address this question, and we can only speculate on potential indirect (genetic) benefits obtained via phonotaxis and mate choice (Andersson and Simmons, 2006; Kotiaho and Puurtinen, 2007). Concerning female preference for male song broadcast at higher peak amplitudes, aside from the superior neural stimulation evoked by louder song and the more direct orientation that may result, one could readily propose that peak amplitude is a reliable indication of a male's 'condition'. This condition may represent his capacities to acquire and assimilate food resources during larval development in a competitive social environment. Or, the condition may simply represent a heritable capacity to produce an attractive song, which assures a female that she will likely produce attractive male offspring. These two possibilities represent the 'good genes' (indicator) and Fisherian (arbitrary) mechanisms of sexual selection, respectively (see Kokko et al., 2002). We now ask whether one can propose analogously that a male's demonstrated ability to attain amplitude maxima – either peak or r.m.s. measures – that greatly exceed mean values offers similar assurance to a discriminating female? Perhaps these maxima cannot be produced in the absence of superior condition and the requisite genotype? Here, we suggest that the negative correlations observed between a male's mean peak amplitude and his coefficient of variation of peak amplitude pose a problem for the hypothesis that amplitude maxima serve as reliable indicators of male quality (see Searcy and Nowicki, 2005). On the one hand, we could expect that males who are deficient in some way and relegated to singing at low amplitudes might compensate for their inferior broadcasts by producing brief amplitude maxima. However, assuming that mean song amplitude is a reliable indication of male quality, females will receive conflicting information on such quality if they also evaluate amplitude maxima and orient toward males who produce them. But our

experiments have not examined the relative weighting of mean amplitude and amplitude maxima in female evaluation of male song, and it is possible that evaluation of amplitude maxima merely refines the overall assessment of song. Thus, the several hypothetical processing mechanisms of song amplitude may provide hierarchical information on male competitive capacity and quality. Although we observed no significantly positive correlations between male mass and either amplitude maxima or the coefficient of variation of amplitude maxima, we suggest that mass does not necessarily represent an index of competitive capacity and quality (see Kasumovic and Andrade, 2009; Lehtonen and Lindstrom, 2009).

Our experimental findings and analyses motivate us to ask whether the markedly fluctuating amplitude levels observed in the songs of some male *A. grisella* reflect selection imposed by female choice? Such sexual selection would be consistent with the female preference observed for fluctuating as opposed to standard signals, but it is at odds with the absence of positive correlations between mean amplitude and the indices of amplitude fluctuation, and the expectations of signal reliability. Moreover, although the range of fluctuations observed for the r.m.s. amplitude of pulse pairs does surpass the magnitude of fluctuations in modified signals that elicited female preference in choice tests (**Figure 7B,D**), the range of fluctuations observed for the peak amplitude of pulse pairs does not (**Figure 7A,C**). This latter discrepancy could reflect mechanical constraints on the production of amplitude maxima. Thus, until we learn more about female evaluation of amplitude maxima, we cannot reject an alternative possibility that fluctuating amplitude levels simply represent a byproduct of the kinesiology of wing beating and the mechanics of song production.

Failure to resolve the various evolutionary questions notwithstanding, our findings reveal the complexity with which signal amplitude may be evaluated in animal communication. Several mechanisms of evaluation may occur simultaneously, and they may have selectively favored certain processes by which signals are generated. Evaluation of signal amplitude by the receiver, as well as its control by the signaler, clearly deserve further attention at both neuroethological and behavioral levels.

Acknowledgments

We thank Laura Buratti for technical assistance, Jean-Pierre Chartier for providing our *A. grisella* population, and the Agence Nationale de la Recherche (contrat ANR-07-BLAN-

0113-01), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université François Rabelais de Tours, and the Ministère de l'Education of France for their financial support. We also thank Sylvain Alem, Marlène Goubault, Claudio Lazzari and several anonymous referees for valuable criticisms of an earlier version of this manuscript.

- CHAPITRE 2 -

Architecture génétique de la préférence femelle et du
chant mâle chez un papillon acoustique

J'ai pu observer au cours de cette première partie, que les femelles de ce papillon acoustique étaient capables de discriminer finement les fluctuations d'intensité du signal ultrasonique émis par les mâles. Au cours de la sélection intersexuelle, il va alors être primordial que le chant des mâles soit en accord avec les préférences femelles. Ces dernières vont en effet, analyser et évaluer une multitude de caractéristiques des signaux acoustiques produit par les mâles présents dans leur environnement pour ensuite choisir leur unique partenaire. Inévitablement, une évolution parallèle entre les signaux et les préférences va s'opérer afin d'optimiser au mieux le processus de choix du partenaire lors de la sélection sexuelle.

Dans cette seconde partie, je me suis attaché à comprendre les mécanismes de cette sélection en étudiant les possibles relations génétiques entre les traits du signal mâle et ceux de la préférence femelle. Selon la théorie de la sélection sexuelle, on s'attend à trouver une corrélation génétique, mais il existe encore très peu de données sur ce phénomène général. Comme ce papillon à une reproduction de type « lek », une question majeure se pose ici quant au maintien du choix femelle en l'absence de bénéfices directs pour ces dernières. De même, comment expliquer la présence et l'évolution de traits mâles exagérés chez cette espèce. Ces facteurs suggèrent la présence d'un mécanisme indirect (bénéfices génétiques) et l'existence d'une covariance génétique entre les deux traits. Ce mécanisme expliqué et développé par Fisher propose des solutions pour expliquer ces observations, et permettre ainsi aux femelles en maintenant un choix, d'obtenir des bénéfices génétiques et engendrer ainsi des descendants attractifs. Néanmoins, sans information précise sur cette covariance, le mécanisme reste invérifié et les trajectoires évolutives des traits de signal et de préférence demeurent inconnues.

Or, peu d'études se sont intéressées à déterminer l'existence ou non d'une telle covariance. De même lorsque celle-ci a été avérée, encore moins d'études ont tenté de démontrer l'origine de cette covariance génétique entre les gènes qui influencent les traits du signal et ceux de la préférence femelle. Ainsi, cette covariance peut s'expliquer par un accouplement non-aléatoire qui induit un déséquilibre de liaison ou bien encore par une liaison physique entre les gènes responsables. Comme chez *Achroia grisella*, le choix femelle se base sur le chant mâle et que ces derniers ne fournissent pas de bénéfices directs, on s'attend à observer une corrélation génétique entre le chant et la préférence. Cependant, cette

espèce n'étant pas un insecte modèle utilisé pour diverses analyses génétiques ou bien encore génomiques, j'ai dû employer des techniques moléculaires particulières pour arriver à mettre en lumière l'origine de la coévolution des différents traits intervenant lors du choix du partenaire.

J'ai donc utilisé 2 lignées fixées de papillons, provenant de la Floride et du Kansas, ayant des phénotypes de chant et de réponse bien différents, que j'ai ensuite croisé entre elles sous forme de backcross afin de réaliser les analyses génétiques. En effet, à partir de la descendance que je vais tout d'abord phénotyper pour les différents traits, je vais ensuite construire une carte génétique de cette espèce en utilisant des marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Cette carte génétique me permettra alors de localiser, s'ils existent, des QTLs (Quantitative Trait Loci) qui influencent le chant mâle et la préférence femelle. Trouver une co-localisation de certains QTLs associés à la préférence et au signal me permettrait alors d'expliquer l'origine de la covariance génétique qui s'observe dans les différentes populations.

L'article qui suit présentera les différentes expériences phénotypiques et génotypiques que j'ai réalisés et qui ont conduit à mieux comprendre l'origine et la nature des traits impliqués dans le processus de sélection sexuelle.

Article 2

The genetic architecture of female preference and male song in an acoustic moth

Limousin, D., Streiff, R., Courtois, B., Dupuy, V., Alem, S. and Greenfield, M. D.
In prep.

Abstract

Models of indirect (genetic) benefits sexual selection predict linkage disequilibria between genes that influence male traits and female preferences, owing to either non-random mate choice or physical linkage. Such linkage disequilibria (genetic correlation) can promote and accelerate the evolution of male traits and female preferences to exaggerated levels. Nonetheless, relatively few empirical studies have measured the genetic correlation between male traits and female responses in natural populations, and even fewer have determined whether an observed correlation was the result of either non-random mate choice or physical linkage (e.g. pleiotropy). We studied signals and preferences in an acoustic pyralid moth, *Achroia grisella*, in which males attract females with a rhythmic train of sound pulses and females prefer songs that are loud and delivered at a faster rhythm. Both male acoustic signal characters and female preferences are repeatable and heritable traits. In addition, female choice is based largely on male song, while males do not appear to provide direct benefits at mating in this species. In this context some genetic correlation between song and preference traits is expected. We employed a standard crossing design between inbred lines of *A. grisella* and used AFLP loci to build a genetic map for this species and locate quantitative trait loci (QTL) that influence male song and female preference for song. Our analyses mostly revealed QTLs of modest strength that influence various male song and female preference traits, but one QTL was found that exerts a major influence on the pulse-pair rate of male song, a trait that is critical in female attraction. On the other hand, we found no evidence of specific co-localization of QTLs influencing male signal and female preference traits on the same linkage groups. Similarly, other work performed at a quantitative genetic level failed to identify any significant genetic correlation resulting from non-random mate choice. These findings suggest that the sexual selection process would proceed at a modest rate in *A. grisella* and that evolution toward exaggerated character states may be tempered. We suggest that this equilibrium state may be more the norm than the exception among animal species.

Introduction

Observations and experiments in both the laboratory and field indicate that sexual selection is a major evolutionary process in natural populations (Andersson, 1994; Andersson and Simmons, 2006). Various studies show that sexual selection plays a significant role in shaping morphological, behavioral, and life history traits exhibited by males and females. This role is particularly evident in the communication that occurs in the context of mate advertisement and courtship, where both intra- and inter-sexual selection appear to have influenced the evolution of signaling and of perception and evaluation of signals. Inter-sexual selection, in particular, is generally claimed to be responsible for the evolution of exaggerated male signals such as complex song or extravagant plumage, and the discrimination and sensitivity displayed by females assessing males based on the characteristics of their signals. However, some controversy exists on whether sexual selection is a potent force acting on these extravagant traits (Andersson & Iwasa, 1996).

The evolution of female discrimination may be relatively straightforward in those cases where preference for a given male would yield superior direct benefits (e.g. resources on a defended territory, paternal care, absence of transmissible parasites) which increase female survival or the number of her offspring. However, biologists have also been aware of many cases where such benefits appear unlikely, and their absence posed a major problem in animal behavior (Andersson, 1994): Why do females expend considerable effort on mate choice where tangible advantages may not be forthcoming? Because this problem is notably conspicuous in lekking species, the issue became known as the ‘paradox of the lek’.

Fisher (1930) described a genetic mechanism of sexual selection, later modeled formally by Lande (1981) and Kirkpatrick (1982), that offers a potential solution to the above paradox. Stated briefly, if a preference for a particular male signal character happens to arise among females in a population, the preference trait can increase in frequency whether or not it leads to improved female survival or offspring number. Rather, females exercising this choice – even when it is an arbitrary one that appeared by chance – will benefit by producing male offspring that are simply attractive. That is, once a female preference becomes prevalent within a population, selection pressure will act on all females to exhibit that choice because failing to do so would lead to producing unattractive sons who would mate little or not at all. Theoretically, this process, the ‘Fisherian mechanism’ of sexual selection, will operate provided that three factors are present: heritability of the male trait, heritability of the female

preference, and additive genetic covariance between the two traits. Various formulations suggest that the level of the third factor, genetic covariance, will influence the rate and extent to which trait exaggeration develops.

To date, biologists have found considerable evidence for additive genetic variance and heritability for male signal traits, and a somewhat smaller amount of corresponding evidence for female preference traits. This disparity may reflect the greater difficulty generally encountered in measuring preferences than signals. However, the measurement of additive genetic covariance between male signals and female preferences may yet be an order of magnitude more difficult to estimate in natural populations, and here we have precious few data. In general, we do not know whether individuals who carry alleles favoring the expression of certain (male) signal traits are likely to also carry alleles favoring the expression of (female) preference for those traits. This lack of information has impeded our understanding of how the Fisherian process might function in natural populations.

Theoretically, additive genetic covariance between male signals and female preferences may originate from two different sources, non-random mating and physical linkage. Traditionally, biologists have proposed that non-random mating would generate covariance by virtue of a positive feedback process: Once a preference is initiated within a population, when a female chooses a particular male because of his signaling, she is actually choosing ‘genes’ for her offspring that favor expression of such preference as well as ‘genes’ that favor expression of the preferred signal. In other words, the chosen male is likely to be the offspring of a mother who had exhibited the particular preference. Thus, the linkage disequilibrium between these genes would increase with the passage of generations. However, it may also be noted that a linkage disequilibrium arising due to non-random mating is a fragile state. For example, when genotype x environment interaction is present, environmental change and migration may seriously degrade such genetic covariance. On the other hand, genetic covariance that reflects physical linkage – either pleiotropy or the co-localization of signal and preference genes within a given genomic region experiencing little recombination – would resist these factors (Bakker and Pomiankowski, 1995; Kirkpatrick and Hall, 2004). Consequently, this latter origin of genetic covariance between male signals and female preferences could be the more likely one. A number of biologists have recently entertained the possibility that signal and preference genes operating in the context of species recognition and speciation are physically linked (Gleason et al., 2005; Shaw and Lesnick, 2009), but fewer

have done so for genes operating in the context of mate choice (Bakker, 1993; Ritchie et al., 2005; Qvarnström et al., 2006; Zhou et al., 2011).

We addressed the question of the level and origin of additive genetic covariance between signal and preference genes in an acoustic pyralid moth, *Achroia grisella*, in which males broadcast an advertisement song attractive to females. Previous behavioral tests and playback experiments in the laboratory have confirmed the presence of female choice and that a substantial proportion of it involves evaluation of male song characters. Importantly, no evidence suggests that female *A. grisella* obtain any direct benefits, e.g. spermatophore nutrients, by mating with a given male. Quantitative genetic studies conducted on several populations indicate substantial additive genetic variance (V_A) and heritability for various male song characters as well as for the nature of female preference for those characters (Collins et al., 1999; Brandt and Greenfield, 2004). Based on these several factors, one predicts that the female choice for male signals observed in *A. grisella* reflects the Fisherian mechanism, which would be sustained by a certain level of genetic covariance.

To assess genetic covariance, we bred hybrid and backcross generations from two different inbred lines of *A. grisella* and implemented a standard quantitative trait locus (QTL) procedure using a linkage map developed from amplified fragment-length polymorphism (AFLP) molecular markers, to elucidate the genetic architecture of different traits. This QTL map included male signal and female preference traits as well as several developmental traits. Thus, we attempted to determine the number of loci having major influences on male signal and female preference traits, their relative importance and their distribution within the genome. In particular, we focused on the possibility of co-localization of signal and preference QTLs on the same linkage groups (chromosomes) and in the same regions within a group. We note that this molecular method would not detect genetic covariance that arose due to linkage disequilibrium from non-random mating. Such examination would require a specialized study of populations in the field or immediately after collection, i.e. prior to the degradation of linkage disequilibrium that inevitably occurs in laboratory populations. In *A. grisella*, it has been the subject of a parallel investigation conducted with several North American populations.

Ecology and reproductive behavior of *Achroia grisella*

A. grisella (lesser waxmoth) are obligate symbionts of the western honeybee (*Apis mellifera*) and are found in most geographic regions of the world to which honeybees have spread (Kunike, 1930). The moth larvae feed on honeycomb and other organic material at honeybee colonies (Kunike, 1930), and they normally infest colonies that have low worker populations owing to more serious parasites or other causes of decline. Mating activities occur in, on, or near the colony, and females subsequently oviposit there provided that some food remains (Greenfield and Coffelt, 1983). The adult longevity of *Achroia grisella* is markedly short. Female and male adults survive only 7 and 10–14 days, respectively, and they neither feed nor drink (Greenfield and Coffelt, 1983).

Males advertise to females with a courtship song that consists of an incessant train of ultrasonic pulses (Spangler et al., 1984). They produce their song for 6–10 h each night until death while remaining stationary on the substrate and fanning their wings at 35–50 cycles per second (rate as measured at 25°C). Wing-fanning causes a pair of small tymbal structures situated at the base of each forewing to resonate, once on the upstroke of the wings and once on the downstroke. Each resonance yields a brief (80–130 μ s) pulse of relatively intense sound [peak amplitude = 90–95 dB SPL (sound pressure level) at 1 cm; 0 dB SPL=20 μ Pa] comprising frequencies from 70–130 kHz. Because the left and right tymbals do not resonate in perfect synchrony, two pulses, separated by a brief ‘asynchrony interval’, are normally produced during both the upstrokes and downstrokes of the wings. Thus, a wing-fanning male generates pulse pairs and does so at 70–100 pulse pairs s^{-1} , twice the rate of cycles of wing movement.

Female *A. grisella* respond to these acoustic displays of potential mates by running toward the acoustic source, rather than flying, and they may exhibit such phonotaxis over a distance up to 1 m (Greenfield and Coffelt, 1983). Previous playback experiments in which synthetic calling song stimuli were broadcast in a laboratory arena showed that females prefer male songs whose pulses have greater peak amplitude, are delivered at a faster rhythm, and that include longer silent gaps (asynchrony intervals) within the pulse pairs (Jang and Greenfield, 1996; Jang and Greenfield, 1998; Limousin and Greenfield, 2009). Females usually mate only once and become unreceptive thereafter, whereas males can mate once per day for several consecutive days. There is no evidence that females obtain direct benefits such as paternal care or spermatophore resources by virtue of mating with a given male.

Experiments conducted with several *A. grisella* populations showed that considerable variation exists among individual males in the song characters that influence attractiveness to females (Jang and Greenfield, 1996; Limousin and Greenfield, 2009) as well as in overall attractiveness of male song (Jang and Greenfield, 1998; Reinhold et al., 1998). Quantitative genetic analysis of these populations have also shown that the various male song characters and overall attractiveness are repeatable within individual males (Jang et al., 1997), and breeding experiments have confirmed their heritability (Collins et al., 1999; Brandt and Greenfield, 2004). More limited work with female *A. grisella* has revealed analogous phenotypic variation, repeatability, and heritability in female preference traits. These traits entailed the minimum (threshold) value of a song character (pulse-pair rate) that elicited female response and the relative emphasis that females placed on different song characters (pulse-pair rate and asynchrony interval) when evaluating male song. Such findings were critical for our expectation that genetic covariance exists between male song traits and female preference traits in *A. grisella* and that the Fisherian mechanism of sexual selection operates in this species.

Materials and Methods

Moth stocks and rearing

We used two random inbred lines, one initially developed from a population collected in Kansas (USA) and the other in Florida (USA). Each line was derived from a full-sib crossing scheme maintained for more than 30 generations. Both larvae and adults were kept in an environmental chamber at $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ under a 12:12h L: D photoperiod. The moth larvae were reared on a standard diet containing wheat, corn and rye flours, water, glycerol, nutritional yeast, honey and beeswax [modified from Dutky et al., 1962].

Crossing scheme

Female Kansas (KS) moths were crossed to male Florida (FL) moths and the male progeny (F₁) of this cross were backcrossed to Kansas females to produce F₂ individuals. Only F₁ males were used in this design, since Lepidoptera females lack recombination and do not help

to produce a distance-based recombination map (Heckel et al., 1999). Combining male and female progeny has proved to be a powerful strategy in some cases for QTL discovery, but due to experimental limitations we restricted our study to progeny issued from F₁ males (see mapping analysis below). F₂ females and males were sampled during the pupal stage and kept individually in 30-ml plastic cups to ensure that the eclosing individuals experienced a similar social environment. This individual rearing was essential because females usually mate only once and become sexually unreceptive thereafter. A preliminary genotyping of a subset of the Kansas and Florida lines revealed that they were not entirely fixed (= homozygotes), as would be expected after 30 generations of full-sib breeding. This unexpected outcome of the breeding protocol did not allow us to pool the several broods and analyze them as a single entity. We thus kept the broods with the largest sizes to produce individual maps of each brood, and we then linked the resulting genetic maps through common markers. Among 24 broods produced, we kept the two broods (Xt7 and Xt19) with the largest number of F₂ individuals, i.e. 35 males and 33 females for the Xt7 brood, and 26 males and 26 females for the Xt19 brood.

Phenotype analysis

Measurement of developmental traits

We noted the developmental time (GR), reported in days from oviposition to adult eclosion, and the mass ($\pm$ 0.005 mg, determined with a Mettler Toledo AX105 DeltaRange balance) immediately following eclosion of all insects. Body mass of males and females were scored as separate parameters (MASS. M and MASS. F) and are tabulated as such in **Tableau 2**.

Trait Code	Trait Full Name and Unit
MASS	Mass of males and females, combined (mg)
MASS. M	Mass of male individuals (mg)
MASS. F	Mass of female individuals (mg)
GR	Duration of development from oviposition to adult eclosion (d)
PR	Pulse-pair rate (pairs/s)
AI	Mean asynchrony interval (μ s)
PA	Mean peak amplitude of male song (arbitrary linear units)
PREF	Female preference for the low-PR signal (number of trials in which this choice is expressed)
TIME	Interval from female release to her arrival at a loudspeaker (s)

Tableau 2: Trait codes, full names and their units.

Measurement of the male signal trait

For recording song, males were kept in small screen cages (1.5 cm diameter, 2.0 cm height) placed in an acoustically insulated chamber with environmental conditions identical to those during rearing except that diffuse red light (25 W, incandescent) provided illumination. Preliminary recordings confirmed that males sang normally in these cages and that the screen did not modify the acoustic parameters of the song (Jang et al., 1997). We placed a barrier of acoustic insulation foam between neighboring males and maintained a minimum distance of 30 cm between adjacent males to prevent a male's song from being influenced by acoustic interactions with neighbors (see Jia et al., 2001). This design also attenuated the effects of neighbors' songs (crosstalk) in the recordings of a focal male. We allowed the males to acclimate in the chamber for at least 15 min prior to recording. We used a condenser ultrasound microphone (model CM16/CPMA; Avisoft Bioacoustics; Berlin, Germany; frequency response: ± 3 dB, 20-150 kHz), positioned 20 cm from the male and oriented toward him to record his song. The microphone output was digitized with an analogue: digital converter (model UltraSoundGate 416-200; Avisoft Bioacoustics) at 16 bits and 500,000 samples $\cdot$ s⁻¹, and we saved a 30-sec sample of this digitized song to a file on a personal computer using signal processing software (BatSound Pro 4.0; Pettersson Elektronik AB; Uppsala, Sweden). From the spectrogram produced from each sampled male, we selected a 1-s segment in the middle of the recording for analysis of acoustic parameters. Our only criterion was that the 1-s segment did not include brief silent gaps that reflected missing pulse

pairs in an otherwise continuous train. We determined the repetition rate of pulse pairs (PR) for the entire segment, the duration of the asynchrony interval (AI), measured from the onset of the first pulse to the onset of the second pulse of a pair, for each pulse-pair, and the peak amplitude (PA), measured in arbitrary linear units, for each pulse. Mean values of AI and PA were then calculated for each male from the data in his 1-s segment (**Tableau 2**).

Measurement of the female preference trait

We conducted all tests of female responses during the initial 6 h of the photoperiodic night, the diel interval during which mating activities in *A. grisella* are maximum. Because *A. grisella* adults neither feed nor drink and female lifespan is only 5-7d, we tested females within 30 h of their eclosion to avoid measuring senescing individuals. All of our playback experiments used a choice protocol in which a female was released in the center of an 80-cm diameter screen arena and presented with simultaneous broadcasts of synthetic male song stimuli from two loudspeakers situated just outside the arena and separated by an azimuth of 120°. The central axes of the loudspeakers were level with the female in the center of the arena, and each loudspeaker was oriented directly toward her. The female was given 120 s in which to orient and arrive within a 10-cm radius of a loudspeaker. All playback tests were conducted in a second acoustically insulated chamber maintained under conditions similar to the chamber used for song recording. Females were brought to the chamber at least 30 min prior to testing, and were held in an acoustically insulated box, isolated from synthetic male song, at all times except during their playback trials. Individual females were tested six times with at least 30 min between successive trials to avoid habituation. Only data from females that responded to a song stimulus in each of the six tests were retained for analysis.

Our analysis was aimed at evaluating whether some females emphasized one signal character in their evaluation of males, while other females emphasized another. Some previous work showed that females evaluate the acoustic power (= amplitude X pulse-pair rate) of the male signal and generally prefer songs broadcast with greater power (Greig and Greenfield, 2004). But when power is held constant, it should be possible to determine a female's emphasis on one or the other of the two components of power. To evaluate this aspect of female preference and to build a 'preference index' for each female, we created two playback stimuli that differed in pulse-pair rate (PR) and amplitude (PA) but broadcast the same acoustic power. One signal had a high PR and a low PA, while the other had a low PR and a high PA. For each of a female's 6 tests, we noted her choice of broadcast (high PR or high PA) and the time

required for her to reach the loudspeaker. Following the 6 tests, we estimated the mean time she spent reaching her chosen loudspeaker (TIME, **Tableau 2**), and we calculated her preference index as the number of trials in which she chose the high PA signal (PREF, **Tableau 2**). The maximum value of this preference index was therefore 6, when a female chose the high PA signal in all 6 tests, and the minimum value was 0. We interpreted values > 3 as an indication of an emphasis on amplitude in evaluation of male song and values < 3 as an indication of an emphasis on pulse-pair rate in song evaluation.

We designed the 2 synthetic stimuli used to determine the female preference index based on songs observed among males in the parental (KS and FL) populations. Thus, we set the pulse-pair rate to $95 \cdot s^{-1}$ and the peak amplitude to 80 dB SPL (0 dB = $-20 \mu Pa$) in the high PR signal, and to $70 \cdot s^{-1}$ and 81 dB, respectively, in the high PA signal. For both signals, peak amplitude was measured in the center of the arena, the location where the test female was released. We adjusted the stimulus SPL to the predetermined values noted above with the aid of a sound pressure level meter (model CEL-430/2; Casella, Kempston, UK; flat frequency response from 30–20,000 Hz), confirmed with a calibrator (model CEL-110/2; Casella). We relied on the method of ‘peak equivalents’ to effect this adjustment by relating the millivolt output of a continuous 20 kHz broadcast, as measured by the condenser ultrasound microphone, to the SPL of this broadcast, as registered by the SPL meter. We then noted the millivolt output of the synthetic song stimulus broadcast as measured by the microphone, and we adjusted the gain on the loudspeaker amplifier until this millivolt output was equivalent to either 80 or 81 dB peSPL (see Jang and Greenfield, 1996). The lower PA value, 80 dB peSPL, was roughly equivalent to the song of a male *A. grisella* 10 cm distant, and it was 6–10 dB higher than average behavioral thresholds observed for female orientation toward male song. The positions of the loudspeakers broadcasting the two stimuli were switched on successive tests to preclude a side bias.

Karyotyping

Because implementation of QTL analysis depended on a precise estimate of the number of linkage groups in *A. grisella*, we undertook a karyotypic analysis of this species. Here, it was assumed that this number would be approximately equal to the haploid number of chromosomes. We made this karyotypic analysis with fresh eggs taken from *A. grisella* females (Kansas population). Eggs were placed in a 1.5-ml tube and washed with a

physiological solution (NaCl 0.9%). After centrifugation (400g for 5 min) and elimination of the supernatant, eggs were placed in RPMI 1640 culture medium with colchicine (0.04 µg/ml final concentration), crushed with a piston pellet and incubated for 3h at room temperature. The supernatant was then eliminated, and the pellet was resuspended in hypotonic solution (KCl 0.075 M) and incubated for 10 min at room temperature. Mitotic chromosomes were then fixed two times with a methanol: acetic acid solution (1:1), spread on slides and, following DAPI staining, counted under a fluorescent microscope.

Genotype analysis

AFLP markers

DNA extraction was performed with the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol, using bodies of adults stored at -80°C as starting material. DNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop 1000 spectro-photometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). AFLP markers were found in these DNA samples according to the method of Midamegbe et al. (Midamegbe et al., 2011) but with some slight modifications: Following a double digestion of ~ 100 ng of genomic DNA with EcoRI and MseI restriction enzymes, two successive selective PCRs were performed with EcoRI+A primer (5' - GACTGCGTACCAATTCA- 3') and Mse+C primer (5' -GATGAGTCCTGAGTAAC- 3') or Mse+G primer (5' -GATGAGTCCTGAGTAAG- 3') for the first and EcoRI+3 primers and Mse+3 primers for the second (**Tableau 3**). Digestion/ligation mixes and PCR conditions were as in Midamegbe et al. (2011). In total, 64 pairs of EcoRI+3 and Mse+3 primers were used. AFLP products were electrophoresed on an ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA) sequencer. Raw data were analyzed with GENEMAPPER© software version 4.0 and individuals were scored for the presence or absence of any given AFLP marker.

Primers	Broods	
	Xt7	Xt19
eAGA mCAC	19	8
eAGT mCAA	13	9
eAGA mCAT	16	8
eAGA mCTA	15	9
eAGT mCTC	9	8
eATC mCAT	24	18
eATG mCAG	20	14
eATC mCAC	17	13
eACA mCAC	19	12
eATC mCAG	14	5
eACT mCAG	18	8
eACC mCTG	16	9
eACC mCAG	21	10
eACA mCAG	16	8
eACT mCTA	29	9
eACT mCTG	21	12
eATG mCGT	8	5
eATC mCGT	16	6
eACT mCGG	12	7
eATC mGCC	13	8
eACG mCAG	14	10
eACA mCTG	11	9
eACT mCAC	12	8
eACA mCGC	14	7
eACT mGAA	11	11
eACG mCTG	12	9
eACC mCTA	17	10
eACA mCTA	11	11
eATC mGCA	12	6
eACA mGTC	14	5
eACT mGCC	13	5
eACG mCGG	6	6
eAGT mCAT	8	5
eACA mCTC	8	3
eACT mCGT	5	3
eACC mGCC	14	8
eACT mGCT	15	10
eACTmCGC	10	5
eATC mCGC	16	9
eATC mGAT	12	9

Primers	Broods	
	Xt7	Xt19
eACAmGCG	5	2
eATC mCTA	16	15
eATC mCGG	16	8
eATG mCTT	9	9
eACC mGTC	11	5
eATG mCAC	16	10
eACT mCTT	19	12
eACA mGAT	12	10
eACT mGCA	23	12
eACA mGCA	14	5
eATC mGCG	8	7
eACG mGTC	13	7
eACCMCAC	-	13
eACAmGAA	-	7
eACAmCAT	-	7
eACAmGTA	-	8
eAGAmCAA	-	9
eACGmCTC	-	3
eACTmCAT	-	5
eACTmCGC	-	7
eACTmCAA	-	7
eATGmCAT	-	6
eAGAmCAG	-	7
eAGAmCGT	-	2

Tableau 3: List of primers used for the AFLP genotyping protocol with the number of informative markers per brood. e = EcoRI (5' -GACTGCGTACCAATTC- 3') and m = Mse (5' -GATGAGTCCTGAGTAA- 3').

Construction of genetic maps

Based on the nature of AFLP polymorphism and the crossing design, we constructed one map for each cross using the 1:1 segregating markers present in the F1 male parent (+/-), resulting from a cross between a Kansas female and a Florida male, and absent in the pure Kansas female parent (-/-). These maps will be referred as Xt7 and Xt19 maps, following the ID code of their respective broods. Linkage analysis was performed with the Joinmap[®]4 software (Van Ooijen, 2006). First, chi-square tests (χ^2) were performed on each AFLP marker for goodness of fit to the expected Mendelian 1:1 segregation ratio. Loci that deviated significantly ($P < 0.001$) from the Hardy-Weinberg expectation were judged as ‘distorted’ and excluded from the map construction. Linkage groups were identified based on a LOD score (logarithm₁₀ (base 10) of odds) of 6. The ordering of the markers within linkage groups was determined by a modified least squares procedure using the default parameters of JoinMap[®]4.0, except that the goodness-of-fit jump threshold for removal of loci was set to 3.0. Recombination values were converted into map distances (in cM) by applying the Kosambi mapping function (Kosambi, 1944).

QTL analysis

QTL analysis was carried out using numerical values for all parameters. The analyzed traits are listed in **Tableau 2**. Computational analysis was carried out using MapQTL[®]5 software (Van Ooijen, 2004). A first preliminary analysis was performed using a nonparametric mapping method (Kruskal-Wallis rank sum test) to detect simple marker/trait association. We then applied the interval mapping algorithm (Van Ooijen, 1992) and selected the QTL position with the highest LOD value for each trait. The minimal LOD value required to declare a QTL was obtained empirically from simulation tests employing 1000 permutations (Churchill and Doerge, 1994). We ran a final analysis using composite interval mapping (CIM) with a maximum of 5 cofactors to account for the possibility that several QTLs might be segregating in the populations. These cofactors represented the nearest markers, detected with the nonparametric mapping method, to each QTL. The confidence interval for each QTL was calculated by finding the locations on either side of its peak that corresponded to a decrease in the LOD score by 1 unit.

Results

Karyotyping

We observed a haploid number of 30 chromosomes in 6 of the 10 microscope slides prepared, and slightly smaller haploid numbers in the remaining 4 slides. Because of the difficulty in spreading the smaller chromosomes in *A. grisella*, we interpreted these results to imply that the true number is 30 and that the observations of lower counts reflected incomplete spreading. This interpretation was then used in considering the number of linkage groups when constructing the linkage maps for the two broods.

Construction of the two linkage maps

733 and 518 AFLP markers were analyzed for the Xt7 and Xt19 broods, respectively. Because of the segregation distortion of some of these markers and the occurrence of unmapped markers, a final count of 442 and 241 AFLP markers were positioned on the Xt7 and Xt19 maps, respectively. Thirty three linkage groups were obtained for Xt7 and 32 for Xt19 at a LOD score of 6. The numbers of linkage groups found in the two broods appear consistent with the cytological observations. We note that these numbers of linkage groups slightly exceed the haploid number of chromosomes observed ($n = 30$), and suggest that this discrepancy reflects the conservative way in which we obtained the maps. However, we observe that some linkage groups have only two markers, showing that both maps are not fully saturated.

The total lengths of the linkage maps were 1390 cM for Xt7 and 599 cM for Xt19, with linkage group length ranging from 3.0 cM to 86.5 cM for Xt7 and 1.0 cM to 57.0 cM for Xt19. The average interval distance between two consecutive markers was 3.4 cM for Xt7 and 2.9 cM for Xt19. The markers were not evenly distributed among the linkage groups. As commonly found with AFLP markers, we observed some clustering regions with multiple markers separated by relatively short intervals but also other cases where neighboring markers were separated by distances above 10 cM.

We compared the two maps based on the position of common markers. Many markers were not scored in one of the two maps, and only 75 ‘useful’ markers, those common to both Xt7 and Xt19, were found among the 608 markers observed in total. Based on these common

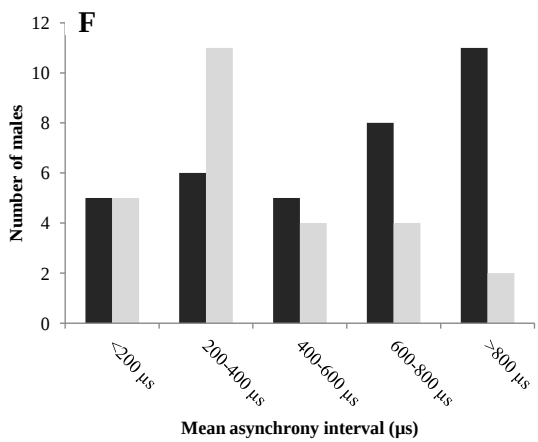
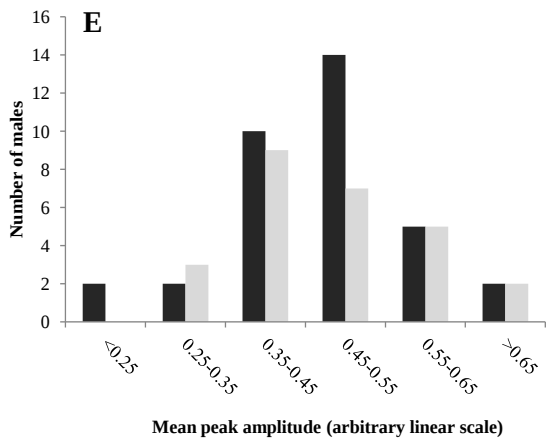
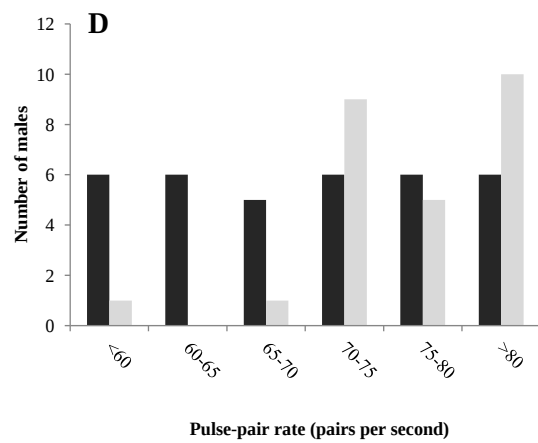
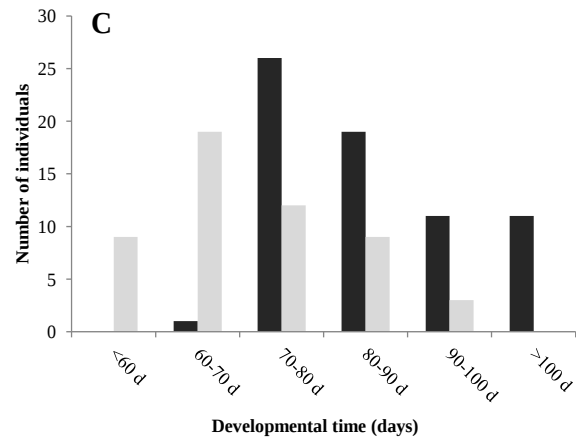
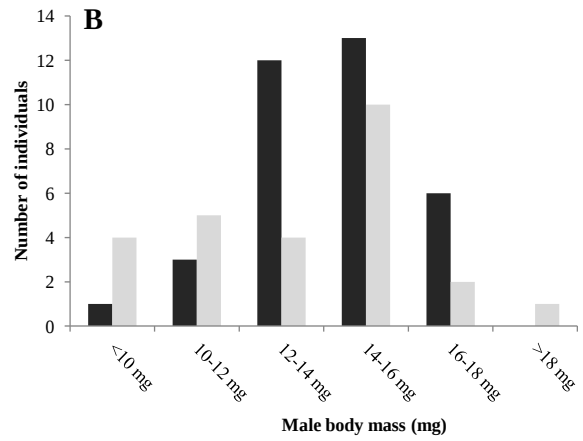
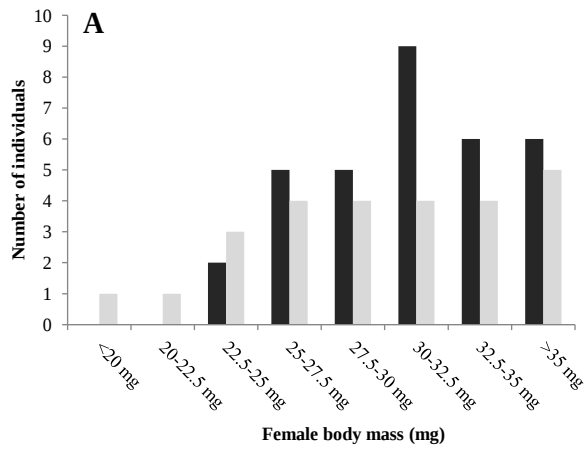
markers, 23 pairs of linkage groups were connected between Xt7 and Xt19. At least two common markers are needed to enable relative orientation of two linkage groups. This criterion of two or more common markers allowed us to determine the relative orientation of 14 pairs of linkage groups. When two or more markers were present in a linkage group in a cross, the marker order was nearly the same for 12 pairs of linkage groups, wherein the few differences concerned only tightly linked markers (inter-marker distances below 4 cM). Because of the small sample sizes of the populations, minor differences in recombination fraction could translate to slightly different orders between the two populations. The marker order differed more strongly for the 2 remaining pairs of linkage groups that had 2 or more common markers. Here, either one marker did not follow the order, or inversion of chromosome segments occurred when linkage group telomeres were involved. These problems occurred in the association of linkage group 3 (LG 3) from Xt7 and LG2 from Xt19 and for LG 16 from Xt7 and LG 10 from Xt19 (**Appendix 1**).

QTL detection and localization

Phenotypic variation was observed for all measured developmental and sexual traits in both broods (**Figure 9**). We found that female mass was approximately the same in the two broods, with average values of 31.03 mg (range from 23.81 to 36.65 mg) in Xt7 and 30.32 mg (range from 18.48 to 43.74 mg) in Xt19 (**Fig. 9A**). For male mass, we also observed similar values in the two broods, with a mean of 14.16 mg (range from 9.72 to 17.49 mg) in Xt7 and a mean of 13.19 mg (range from 7.89 to 18.12 mg) in Xt19 (**Fig. 9B**). However, average developmental time was longer in Xt7 (mean of 86 d; range from 69 to 119 d) than in Xt19 (mean of 71 d; range from 52 to 93 d), (**Fig. 9C**). Male song characters also exhibited variation within each brood but mean values in the two broods were generally comparable. Pulse-pair rates ranged from 54 s⁻¹ to 83 s⁻¹ and from 59 s⁻¹ to 89 s⁻¹, in Xt7 and Xt19, respectively, (**Fig. 9D**). Similarly, mean peak amplitude ranged from 0.234 to 0.704 (arbitrary linear units) and from 0.255 to 0.687 in Xt7 and Xt19, respectively, (**Fig. 9E**). Mean asynchrony interval, the third male signal trait analysed, also showed high variation ranging from 0 to 2904 µs in Xt7 and from 0 to 1135 µs in Xt19, respectively (**Fig. 9F**). For female preference, we observed that some individuals oriented preferentially toward the signal with a low PR and a high amplitude, whereas others preferred the signal with a high PR and a low amplitude. Thus, the preference index ranged from 0 (the female chose the high PR signal in all 6 tests) to 6 (the female chose the high PA signal in all 6 tests), with a mean of 2.85, in Xt19 and from 1 to 5, with a mean of 2.94, in Xt7 (**Fig. 9G**). Furthermore, to arrive at one of the two stimuli, females spent on average more time in Xt7 (mean of 15.6 s; range from 9 to 36.8 s) than in Xt19 (mean of 11.3 s; range from 6.5 to 31.8 s), (**Fig. 9H**). In all cases we observed unimodal, as opposed to bimodal, distributions for the measured traits. Such phenotypic variation was a prerequisite for detecting QTLs influencing the traits of interest.

Composite interval mapping (CIM) was used for QTL detection and localization. This procedure was performed separately for the two broods because of the low number of consensus linkage groups obtained by merging both maps. Despite co-identification of 23 of the 33 linkage groups between Xt7 and Xt19, the small number of linkage markers did not permit an accurate, integrated detection of QTLs. Significant QTLs (LOD score > 1.8, except for two QTLs with scores of 1.3), for each developmental and sexual trait that we measured were detected in both broods Xt7 and Xt19. In total, we found 16 and 20 such QTLs based on

my CIM procedure in Xt7 and Xt19, respectively (**Tableau 4**). Owing to the relatively large number of linkage groups, 33 in each brood, we only exhibit linkage groups on which QTLs were detected in **Figure 10**. Maps for linkage groups not shown in **Figure 10**, are given in detail in **Appendix 1**.



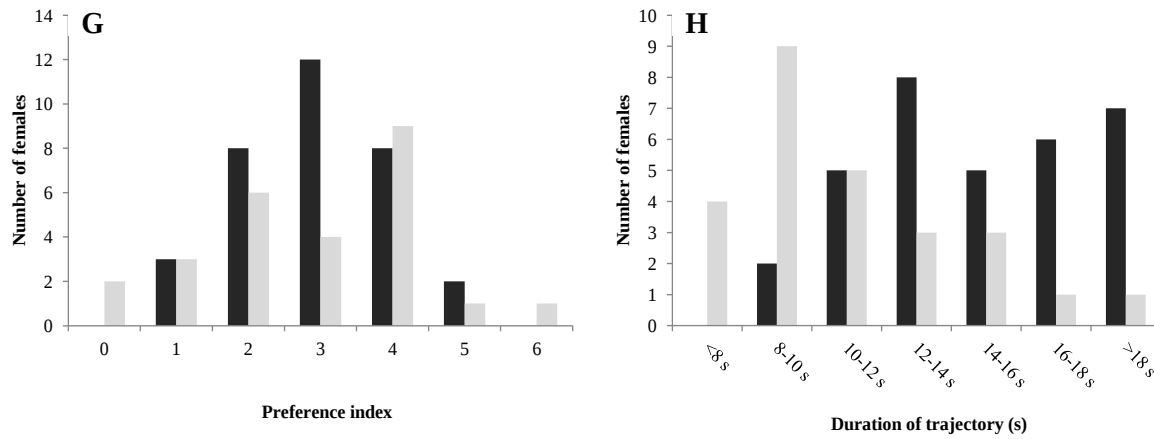


Figure 9: Phenotypic variation of developmental and sexual traits observed in both broods sampled for genotype analysis. In each graph, the dark and light vertical bars represent brood Xt7 and brood Xt19, respectively. (A) Female body mass. (B) Male body mass. (C) Developmental time of tested individuals (D) Pulse-pair rate of male song. (E) Mean peak amplitude of male song. (F) Mean asynchrony interval duration of male song. (G) Female preference index. (H) Duration of female trajectory from release point to arrival at one of 2 stimuli (broadcasting loudspeakers).

We detected QTLs for the several developmental traits measured, notably for body mass. For development time, we found only one QTL, which was located on LG1 and explained 20.7% of the phenotypic variation in brood Xt19. However, for male body mass we found two QTLs in Xt7 and three in Xt19. Similarly, for female body mass we found two QTLs in both broods. All of the QTLs for body mass are localized on independent linkage groups, and they explained from 20.2 % to 32 % of the phenotypic variation in Xt7 and from 15.8 % to 46.7 % in Xt19.

For the male signal traits, we found independent QTLs positioned on different linkage groups for all three signal characters measured. We found only one QTL for asynchrony interval, which was detected in each brood and explained 26.5 % and 37.5 % of the variation in Xt7 and Xt19, respectively. We identified two and three QTLs for peak amplitude in broods Xt7 and Xt19, respectively. These QTLs explained between 15.2 and 35.1 % of the variation. Similarly, we identified two and three QTLs for pulse-pair rate in broods Xt7 and Xt19, respectively. These QTLs explained 18.9 and 51.7 % of the variation in Xt7 and from 19.9 % to 28.9 % of the variation in Xt19. Details on all of these identified QTLs are given in **Tableau 4**.

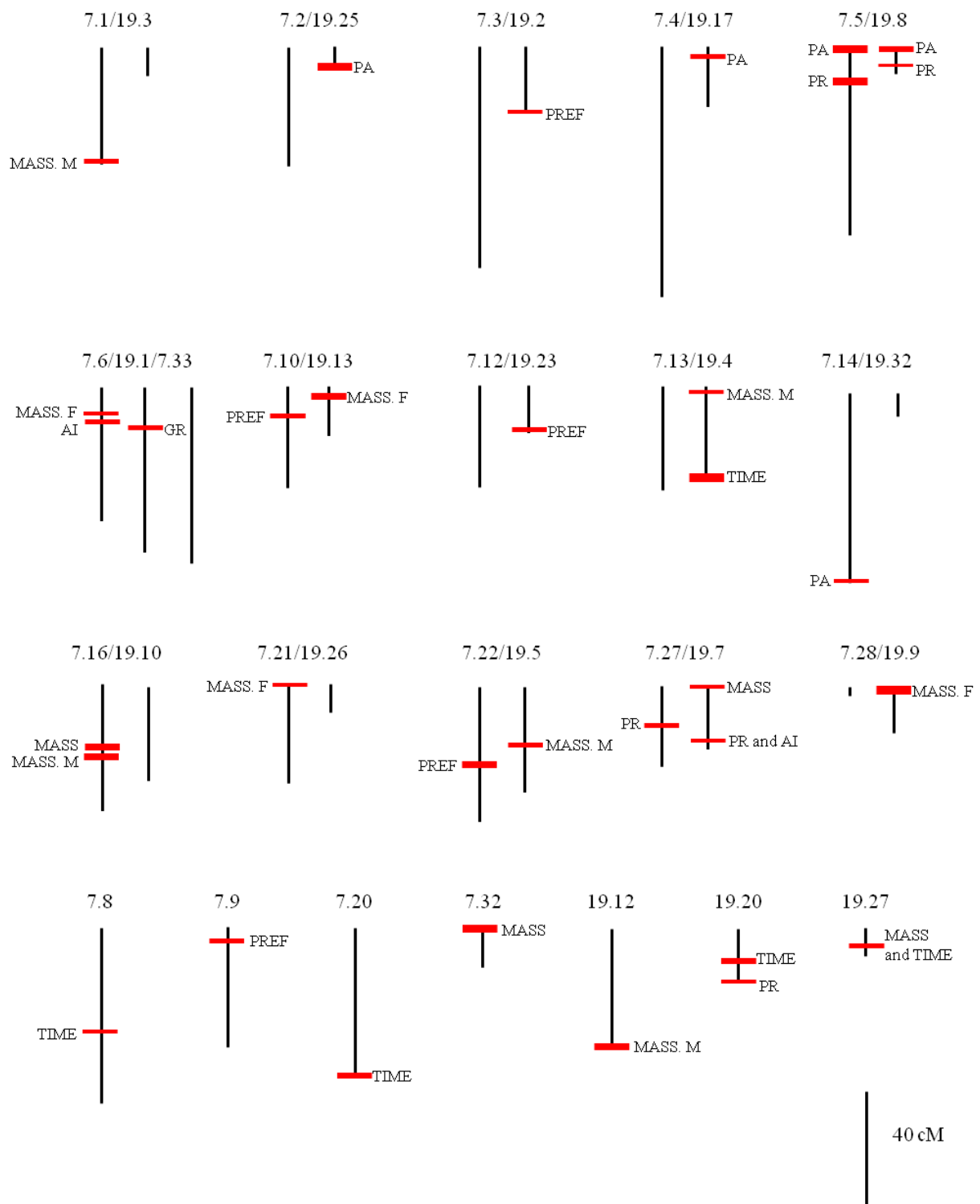


Figure 10: QTL map for developmental and sexual traits. Linkage groups with QTL are represented ; where applicable, linkage groups from the two broods are shown. The red line indicates the position of the QTL, and its thickness is proportional to the LOD value. Linkage group identities (brood ; linkage group number) are indicated above each graph, and names of QTL traits are shown next to the red line. Map distances are in cM, estimated by the Kosambi mapping function.

We found independent QTLs for the female preference index on different linkage groups. In brood Xt7, three QTLs were observed on LG 9, LG 10 and LG 22, respectively, and these explained between 18.4 and 27.4 % of the variation in the preference index. In brood Xt19, two QTLs were found on LG 2 and LG 23, explaining 17.8 and 26.1% of the variation, respectively. We detected two and three QTLs for the time spent reaching a chosen song stimulus in broods Xt7 and Xt19, respectively. These different QTLs explained from 26.3 to 43.4% of the phenotypic variation for this female response trait.

For a given trait, some QTLs were specific to one brood, but a few were found at homologous positions in both broods. By comparing the two broods and relying on common markers in both linkage maps, we observed three QTLs for male song traits (two QTLs for PR and one QTL for PA) that were located on homologous linkage groups in both Xt7 and Xt19. Thus, QTLs for pulse-pair rate (PR) were found on syntenic positions on LG 5 (PR 7.1) and LG 8 (PR 19.2) in Xt7 and Xt19, respectively, and another pair of QTLs for PR were found on syntenic positions on LG 27 (PR7.2) and on LG 7 (PR 19.1) in Xt7 and Xt19, respectively. For peak amplitude (PA), we found QTLs on syntenic positions on LG 5 (PA 7.1) and LG 8 (PA 19.1) in Xt7 and Xt19, respectively (**Figure 9**).

Co-localization on the same linkage group was also observed for different male song traits. Two QTLs for PR and PA were situated in similar positions on homologous LGs in Xt7 and Xt19, and consequently these two QTL may be linked to a male signal parameter that could be characterized as the acoustic power of the signal (**Figure 9**). By contrast, we observed no co-localization between male signal traits and female preference traits. We also observed no co-localization between male song traits and male body mass, as well as between female preference traits and female body mass.

In summary, we note that most of the detected QTLs explained between 15 and 35% of the phenotypic variation of measured traits in brood Xt7 and between 15 and 47% in brood Xt19. These values imply that several genetic factors with minor effects probably influence the various developmental and sexual traits. We also note that one QTL detected for pulse-pair rate in brood Xt7 (PR7.1) explained 51.7 % of the phenotypic variation. This value suggests that at least one gene having a major influence (> 50% of variation explained) affects the variation in this song trait.

(a)									
Trait	LG	QTL Name	Marker Interval		Distance from the telomere (cM)	LOD	Additive	R ² (%)	
Asynchrony Interval	AI	6	AI7.1	PeACCMCTG_350.45	PeACTmCTT_130.66	11.8	2.6	936.77	26.5
Male signal amplitude	PA	5	PA7.1	eATCmCGT_268.73	PeATGmCAC_148.04	0	3.8	-0.085287	35.1
	PA	14	PA7.2	eATCmCGC_210.37	PeACAmGAT_397.05	65.6	1.9	-0.042400	15.2
Pulse pairs rate	PR	5	PR7.1	eATCmCGT_268.73	PeACTmCAC_166.77	16	4.0	-6.42	51.7
	PR	27	PR7.2	eACAmGCA_468.45	eATCmCAG_173.37	13.7	2.2	3.85	18.9
Female preference	PREF	9	PREF7.1	eATCmGCC_110.75	eATCmGCA_351.33	6.1	2.5	0.48	18.4
	PREF	10	PREF7.2	PeACTmCTA_306.69	eACTmCGT_87.09	12.1	2.5	0.45	18.4
	PREF	22	PREF7.3	eACTmCAC_182.31	eAGTmCAA_111.34	27.3	3.5	-0.57	27.4
Time for female choice	TIME	8	TIME7.1	eACCMGCC_243.35	eATCmGAT_103.35	36.8	2.1	-2.13	26.3
	TIME	20	TIME7.2	eACGmCTG_317.64	eACCMCAG_313.36	51.6	2.7	-2.42	32.3
Mass of all individuals	MASS	16	MASS7.1	eACGmCAG_369.38	eACAmCTA_164.32	24	3.2	-4.13	22
	MASS	32	MASS7.2	eAGAmCAC_263.29	eAGAmCAC_400.16	0	3.7	-4.62	23.4
Female mass	MASS. F	6	MASS. F7.1	PeAGAmCTA_267.11	PeACTmCTT_130.66	9.8	1.9	1.76	23.3
	MASS. F	21	MASS. F7.2	eAGTmCAA_128.47	PeACTmGAA_135.45	0	2.0	-1.80	24.4
Male mass	MASS. M	1	MASS. M7.1	eAGAmCAC_420.65	PeAGAmCTA_200.16	39.4	2.5	0.87	20.2
	MASS. M	16	MASS. M7.2	eACAmCGC_176.51	eACAmCTA_164.32	29.9	3.4	-1.19	32
(b)									
Trait	LG	QTL Name	Marker Interval		Distance from the telomere (cM)	LOD	Additive	R ² (%)	
Asynchrony Interval	AI	7	AI19.1	eAGTmCAA_318.11	eATCmGAT_310.62	18.5	2.7	179.75	37.5
Male signal amplitude	PA	8	PA19.1	PeATGmCAC_148.04	PeACTmCAC_166.77	0	3.0	0.053899	21.7
	PA	17	PA19.2	PeACTmCTG_170.82	PeATCmGCC_93.41	3.1	2.5	-0.046967	16.9
	PA	25	PA19.3	eATCmGAT_127.65	eAGTmCAA_116.97	7.3	3.8	0.058194	28.8
Growth time	GR	1	GR19.1	PeACCMGCC_152.01	PeATCmCAT_222.42	12.3	2.6	-4.81	20.7
Pulse pairs rate	PR	7	PR19.1	eACAmCAC_179.37	eATCmGAT_310.62	18.5	1.3	-2.97	20.9
	PR	8	PR19.2	PeATGmCAC_148.04	PeATGmCTT_205.56	5.8	1.3	2.88	19.9
	PR	20	PR19.3	eeACAmCAC_430.21	eACAmGTA_120.0	18.6	1.9	3.66	28.9
Female preference	PREF	2	PREF19.1	PeACAmCAC_133.45	PeACTmGCA_241.6	22.6	1.8	0.63	17.8
	PREF	23	PREF19.2	eACTmCAT_327.57	eACGmCTC_439.07	16.3	2.5	-0.82	26.1
Time for female choice	TIME	4	TIME19.1	eACCMCTA_369.26	PeACCMGCC_123.82	30.9	4.2	-2.22	43.4
	TIME	20	TIME19.2	eeACAmCAC_430.21	PeACTmCAG_257.47	11	2.8	-1.63	26.6
	TIME	27	TIME19.3	eACAmGAA_104.2	eACTmGCA_180.74	5.9	3.3	-1.87	31.2
Mass of all individuals	MASS	7	MASS19.1	eACAmCAC_179.37	eACTmGCT_296.75	0	1.9	3.94	15.8
	MASS	27	MASS19.2	eACAmGAA_104.2	eACTmGCA_180.74	5.9	1.9	3.94	15.8
Female mass	MASS. F	9	MASS. F19.1	PeACCMCTG_132.77	PeATCmCGC_132.74	0	4.4	4.72	46.7
	MASS. F	13	MASS. F19.2	eACCMCAC_238.25	PeACTmCTA_306.69	3.1	3.1	3.50	29.5
Male mass	MASS. M	4	MASS. M19.1	PeATGmCAC_136.75	PeACAmGTC_430.99	3.9	2.1	1.21	17.6
	MASS. M	5	MASS. M19.2	eACTmCGC_214.53	eAGAmCAT_231.11	19.3	2.6	-1.37	24.7
	MASS. M	12	MASS. M19.3	eATCmGCA_329.7	eACTmCTT_113.92	40.3	3.5	-1.70	34.8

Tableau 4: Main effect QTLs determined via CIM mapping in Xt7 (a) and Xt19 (b), with additive (= the estimated additive effect) and R² (= the percentage of the variance explained by the QTL) shown in the two columns at the right.

Discussion

1. *Studies of genetic architecture in different contexts*

The genetic architecture of signaler and receiver traits has been of interest to evolutionary biologists for many years. It was recognized early that the evolution of signals functioning in species recognition poses a difficult problem because novel traits should normally be selected against and disappear. In most cases females would be unlikely to respond to any new male signal variants, a factor that would ultimately tend to stabilize a population and operate against population divergence and speciation. One proposed solution to this conundrum was the so-called ‘genetic coupling’ hypothesis (Alexander, 1962; Butlin and Ritchie, 1989; Boake, 1991), which suggested that genes influencing male signal and female receiver traits might tend to be physically linked or even the same; i.e. signaler and receiver traits are influenced pleiotropically. Thus, a novel male signal would have a female audience at the start, and the processes of signal evolution, population divergence, and speciation could proceed readily (Panhuis et al., 2001; Ritchie, 2007). The basic notion of this hypothesis has been revived recently, and current studies in various animals report that genetic factors influencing signaler and receiver traits in species recognition do appear to be physically linked in some cases (Kirkpatrick and Hall, 2004; Shaw and Lesnick, 2009). Whereas the same expectation of genetic linkage may hold for signaler and receiver traits that operate within the context of evaluation of mate quality, only a negligible number of studies have addressed this possibility in sexual selection.

What factors may account for the relative lack of experimental work on the genetic architecture of sexual selection? Much of this difference probably lies in the subtlety with which females may respond to male signal traits when evaluating potential mates. Species recognition is often accomplished quickly, at the very onset of pair formation, and with attention paid to a single trait that reliably indicates whether another individual is a conspecific or not (Ryan and Rand, 1993; Greenfield, 2002). Thus, biologists can score receiver traits that operate in species recognition relatively easily, and this phenotypic information can be incorporated in a QTL study or other genetic analyses (Ritchie, 2007; Shaw et al., 2007; Shaw and Lesnick, 2009). On the other hand, subsequent behavior in which the quality of an individual already recognized as a conspecific is assessed tends to be

much more complex, often focusing on multiple signal traits (Ritchie, 1996). Consequently, scoring the traits with which receivers assess potential mates is considerably more difficult. In general, it requires an intimate knowledge of the species' behavior and cannot readily be accomplished on the number of individuals necessary for a thorough genetic analysis. In general, receiver traits that function in species recognition tend to impose stabilizing selection on a signal trait, e.g. pulse rate of a male song. That is, a preference is exhibited for mean values of the signal trait, and signalers who display trait values above or below this mean value elicit less attention from receivers (Paterson, 1993). It is this feature of evaluation that makes scoring receiver traits in species recognition relatively simple: An individual is rated by the expression of the signal trait to which it exhibits the maximum response (Gerhardt, 1988; Ewing, 1989; Gerhardt and Huber, 2002).

Evaluation of mate quality, however, often involves some level of directional selection in which receivers show higher and higher levels of response as trait expression increases along some axis; e.g. an elevated response level is shown toward faster pulse rates, at least within the range of rates found in the population (Collins et al., 1999; Brandt and Greenfield, 2004). Scoring this category of receiver traits tends to be difficult because all individuals in the population respond more strongly to faster pulse rates. Rather, differences between receivers may lie in 1) their 'preference function' (Ritchie, 1996), i.e. the steepness with which their response level increases when presented with faster and faster rates, or in 2) their relative 'weighting' of this signal trait, in comparison with other traits, in the overall response to signals (Wagner et al., 1995; Wagner, 1998). Preference function 'shape' is typically evaluated by noting the latency following which a receiver orients toward and localizes a synthetic signal, or by determining the level of directionality with which that localization is made. For example, some receivers may exhibit relatively little decrease in latency or increase in directionality as signal pulse rate is elevated, whereas others show marked changes. Weighting of a signal trait may be evaluated by testing receivers with a range of synthetic signals in which two or more traits are adjusted; e.g. pulse rate and amplitude. Whereas all receivers may prefer faster pulse rates and respond more strongly to a higher amplitude, individual receivers might differ in whether they place more weight on one trait than another. That is, some individuals may prefer signals delivered with a fast rate but at low amplitude when presented with a choice of fast rate / low amplitude and slow rate / high amplitude, while other individuals prefer the opposite. Either preference function shape or the

weighting of signal characters would have to be scored, and scored in many individuals, in order to study the genetic architecture of sexual selection. It is this determination of a complex and somewhat concealed phenotype that represents the major challenge for these studies.

2. *QTLs and genetic architecture in A. grisella*

Owing to detailed information on the behavior of *A. grisella* from many previous studies and the ease with which this species can be bred in the laboratory and tested, we were able to score receiver as well as signaler traits in a mapping population developed specifically for QTL analysis. This analysis revealed QTLs that account for phenotypic variation in several male signal, female receiver, and developmental traits. Most of these QTLs are of modest influence, i.e. less than 35% of phenotypic variance is explained, but one QTL, which influences the pulse-pair rate in male song, explains 51.7 % of phenotypic variance. This latter finding is of particular importance because pulse-pair rate, being subject to directional female preference and uncorrelated (in the populations we studied) with body size, is unambiguously a sexually-selected trait. Moreover, the relative strength of this QTL is corroborated by an earlier artificial selection study in which lines for fast and slow pulse-pair rates were developed after only 3-5 generations of selection (Jia and Greenfield, 1997). Separation of lines in so few generations would not be expected for a trait whose expression is largely under polygenic influence. However, we note that the overall data on percentage of phenotypic variation explained (**Tableau 4**) by the various QTLs suggests that most traits are influenced polygenically. That is, several QTLs are implicated for each trait and, the remaining variation may be explained by environmental influence (i.e. inevitable differences between different rearing containers), QTLs not detected in this study, or genetic factors having only minor effects.

Despite finding QTLs for the various male signal and female receiver traits tested, we did not observe any co-localization of signal and receiver QTLs on the same linkage groups. Several factors may account for this observation, which is contrary to what we had expected. First, we scored only two receiver traits, the latency of a female's arrival at a male song stimulus and her relative weighting of pulse-pair rate vs. amplitude in evaluation of male song. Although we designed the test for the second trait based on observed variation in male

song and my previous studies on female evaluation of song, relative weighting of the two song characters might not be a critical receiver trait that imposes significant selection pressure on male song. That is, absence of evidence does not necessarily imply that colocalization does not exist. Rather, other receiver traits, e.g. the shape of a preference function for pulse-pair rate, may be the critical ones and therefore more likely to be linked with the signal trait. Second, genetic covariance between male signal and female receiver traits may occur only at the level of a linkage disequilibrium resulting from non-random mate choice in a natural population, i.e. female preference for faster pulse-pair rates in male song. However, we point out that a parallel study (Zhou et al., 2011) addressed this possibility in *A. grisella* populations immediately after collection in the field, i.e. before laboratory breeding would have eliminated any linkage disequilibrium due to mate choice (see Bakker and Pomiankowski, 1995), but also failed to detect any significant additive genetic covariance between male signal traits and a female receiver trait.

A third possible factor accounting for the difference between the observed lack of colocalization of signal and receiver QTLs and the initial expectation of its occurrence may lie in the QTLs themselves. Whereas we were able to specify the location of the various QTLs on and within the linkage groups with considerable precision owing to the many (AFLP) markers used and the high chromosome number ($1n = 30$) in *A. grisella*, many of the QTLs reported have relatively low LOD scores and ultimately may prove unreliable. Low LOD scores may largely reflect the small number of individuals sampled, as well as other issues intrinsic to QTL detection. Moreover with low sample sizes, linked QTL may be difficult to detect, and some simulation studies show that small sample sizes can overestimate QTL effects (Beavis, 1998; Lynch and Walsh, 1998). One indication of this potential unreliability is that a QTL for a given trait was often detected on one linkage group in one brood but on another linkage group in the second brood. Such inconsistencies suggest that while some QTLs having elevated LOD scores and explaining a high percentage of phenotypic variation, e.g. QTL PR7.1 for male song pulse-pair rate on linkage group 5 in brood Xt7, may eventually prove to be accurate, others may not as work on genetic architecture in *A. grisella* progresses. Recent findings (Gleason et al., *in prep*) showing considerable synteny between the genomes of *A. grisella* and *Bombyx mori*, for which a detailed sequence exists, offer promise for an improved understanding of QTLs and genetic architecture in *A. grisella*.

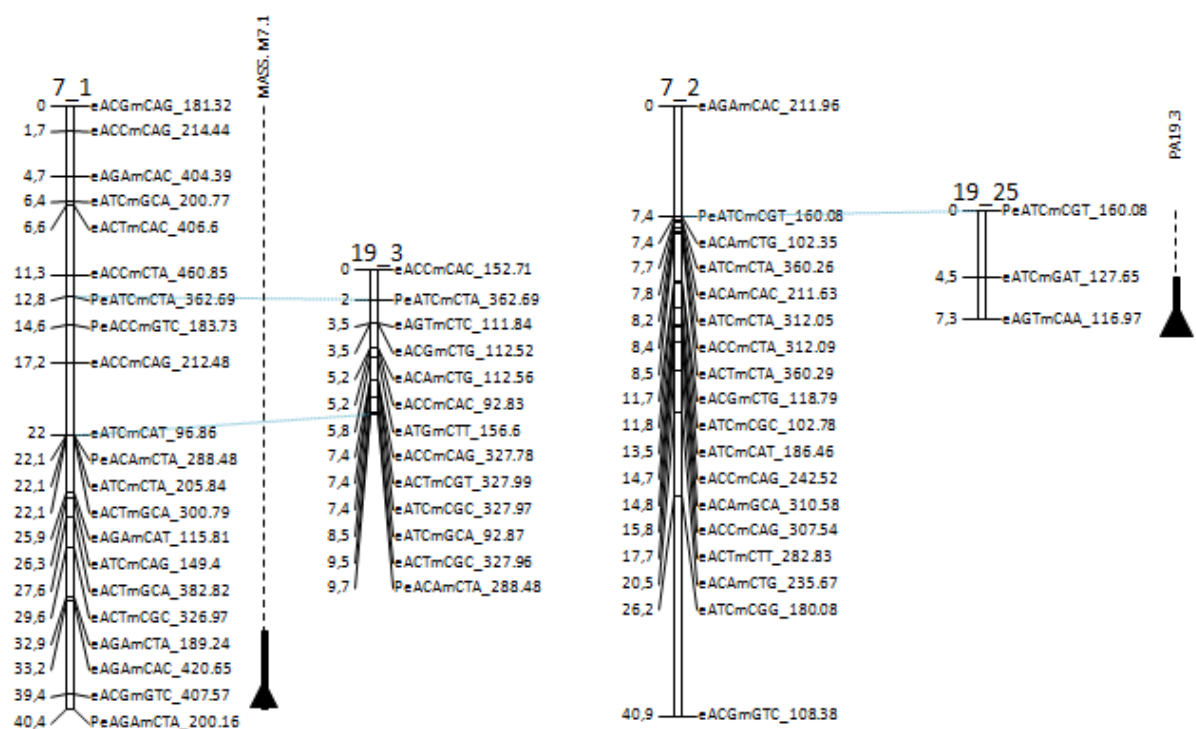
3. *On the tempo of sexual selection in natural populations*

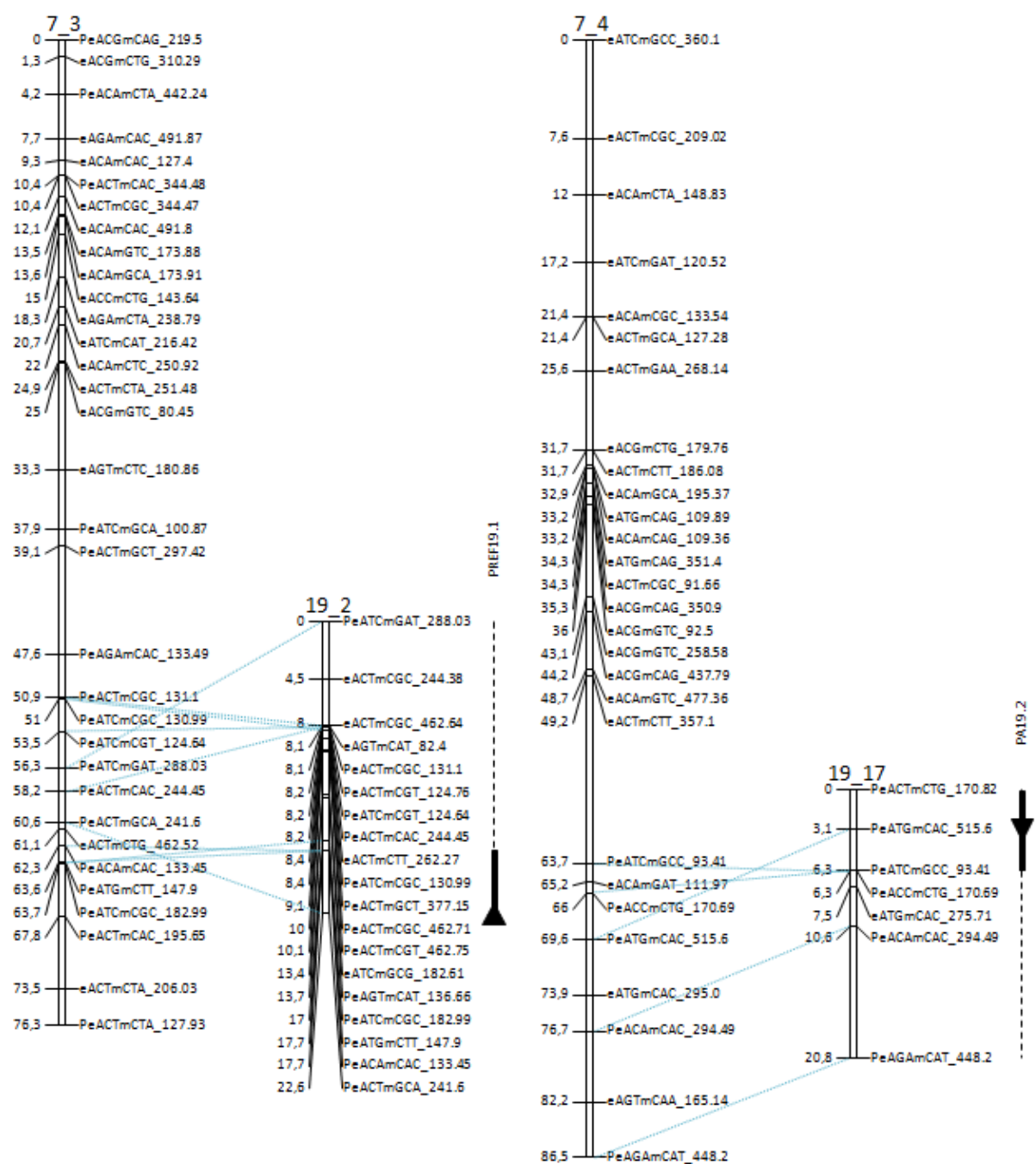
A fourth and final explanation for the observed absence of colocalization of QTLs for male signal and female receiver traits concerns the functioning of sexual selection itself. The expectation of genetic covariance, either due to linkage disequilibrium from non-random mating or to physical linkage, between male signal and female receiver traits is contingent upon a certain level of ‘strength of sexual selection’ (Lande, 1981; Kirkpatrick, 1982), notably a level that generates exaggerated traits. There currently exists some controversy on the appropriate method for measuring the strength of sexual selection in natural populations (Andersson, 1994), and yet more controversy on whether sexual selection is actually a significant factor that shapes traits in males and females (Andersson and Iwasa, 1996). While a prevailing view is that sexual selection does represent a potent force (Andersson and Simmons, 2006), it is possible that this potency arises only occasionally during the course of evolution. If so, we may normally observe signal and receiver traits that are more or less in an equilibrium state during which their trajectory toward exaggeration is markedly tempered. Under such conditions we have no reason to expect any particular genetic covariance between male signal and female receiver traits, and this lack of covariance is what we have observed to date in *A. grisella*. Here, we note that our findings are largely consistent with quantitative genetic studies of sexually selected traits in various animal species, studies which have generally indicated an absence of genetic covariance (Ritchie et al., 2005; Zhou et al., 2011). Thus, an accelerated tempo of sexual selection driven by signal / receiver genetic covariance may be more of an exception than the norm in natural populations.

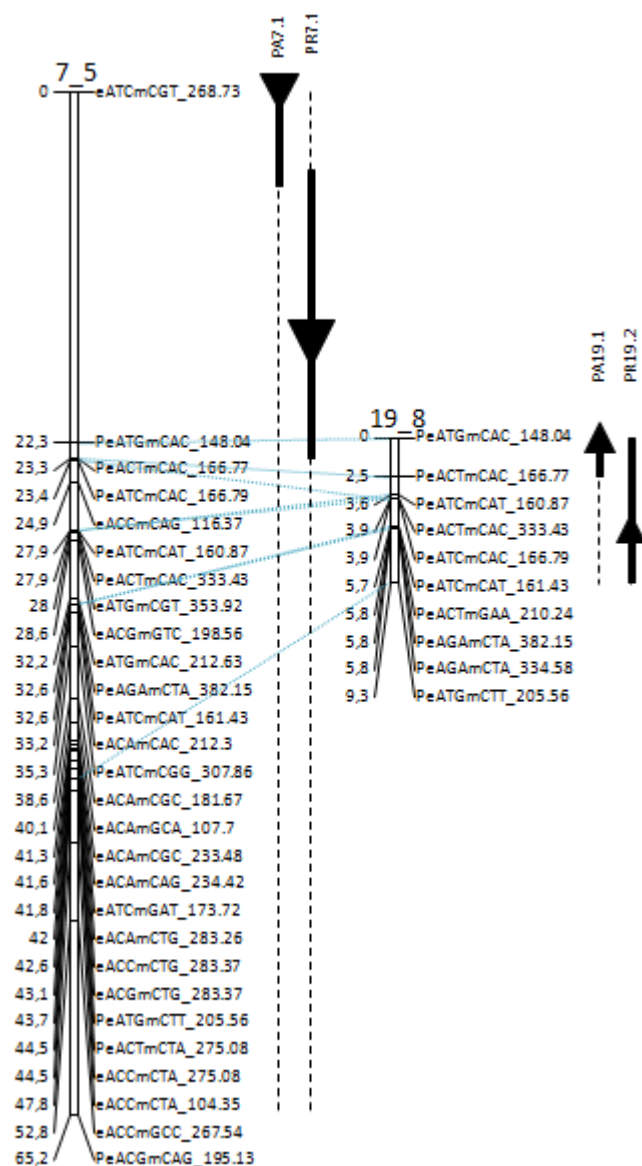
Acknowledgments

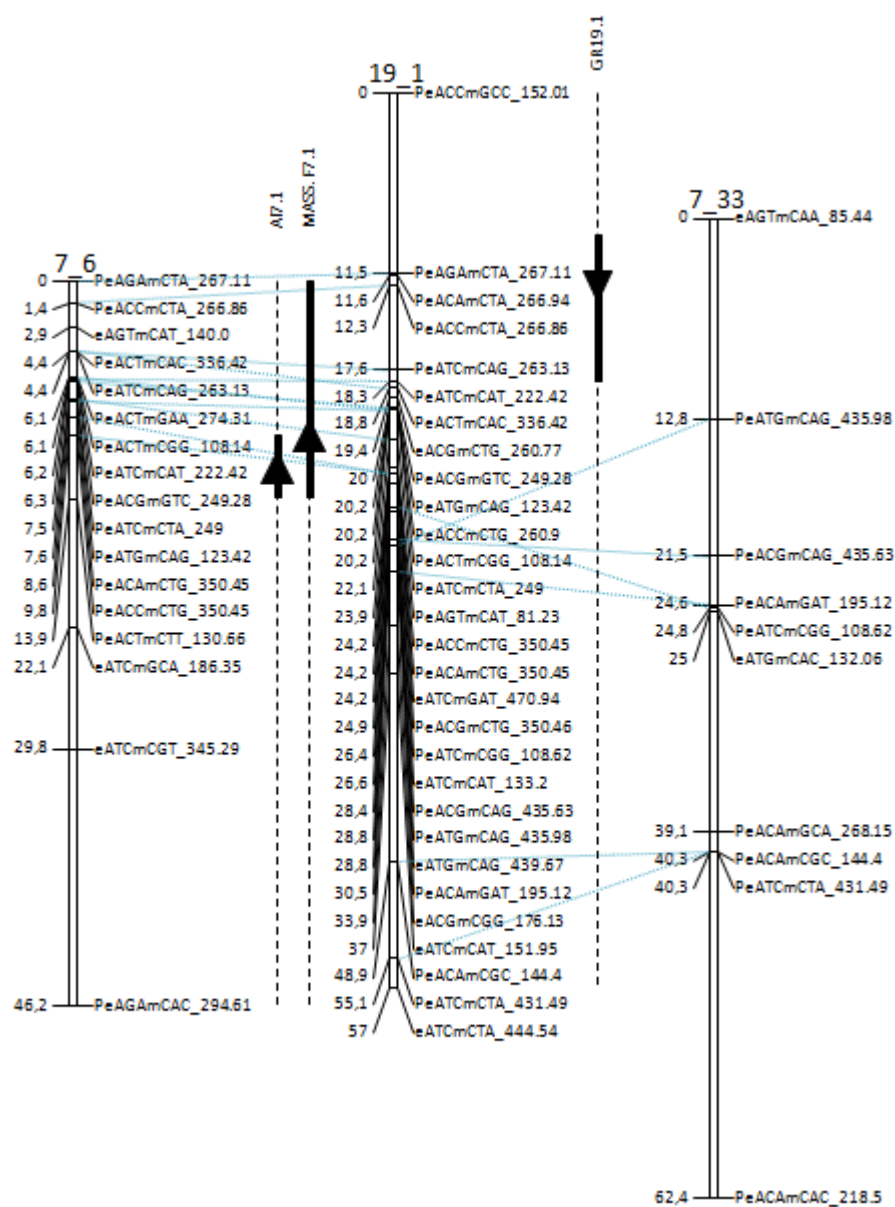
We thank Jennifer Gleason for providing our *A. grisella* inbred lines ; Guy Bourdais and Fabrice Vannier for their technical assistance in rearing and Philippe Gauthier for karyotyping. We also thank the Agence Nationale de la Recherche (contrat ANR-07-BLAN-0113-01), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université François Rabelais de Tours, and the Ministère de l’Education of France for their financial support.

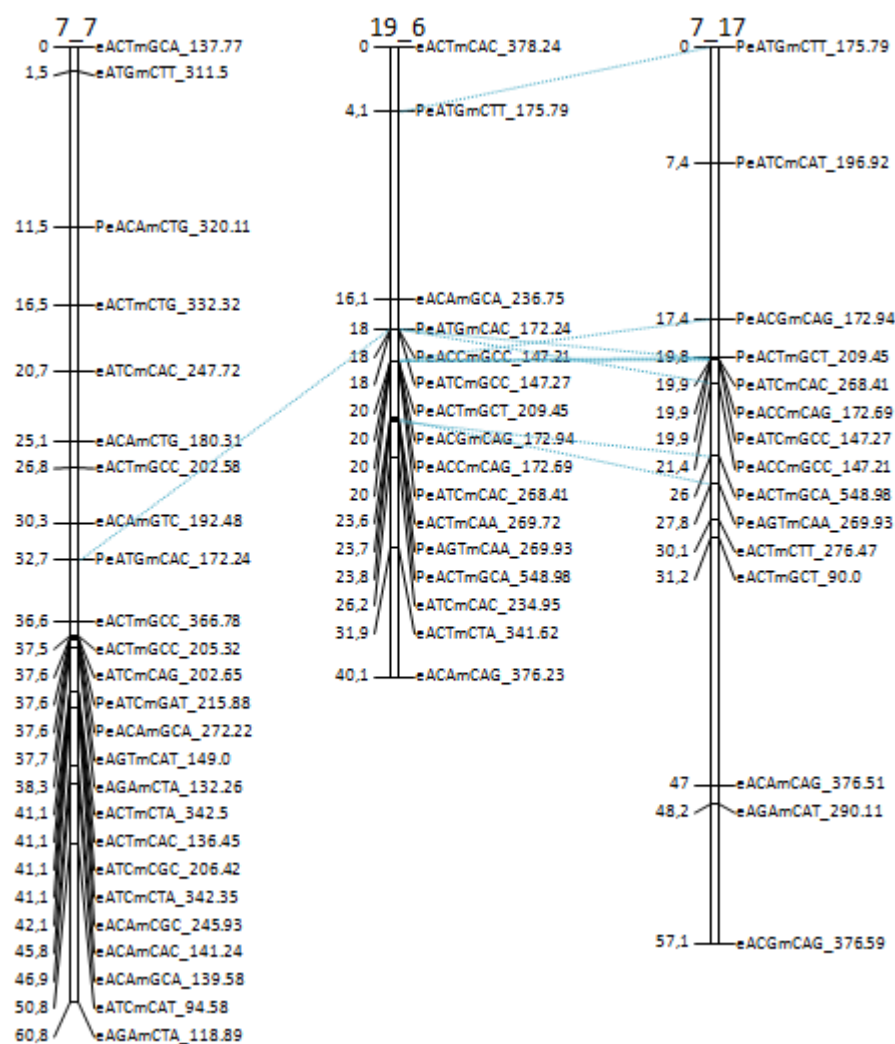
Appendix 1

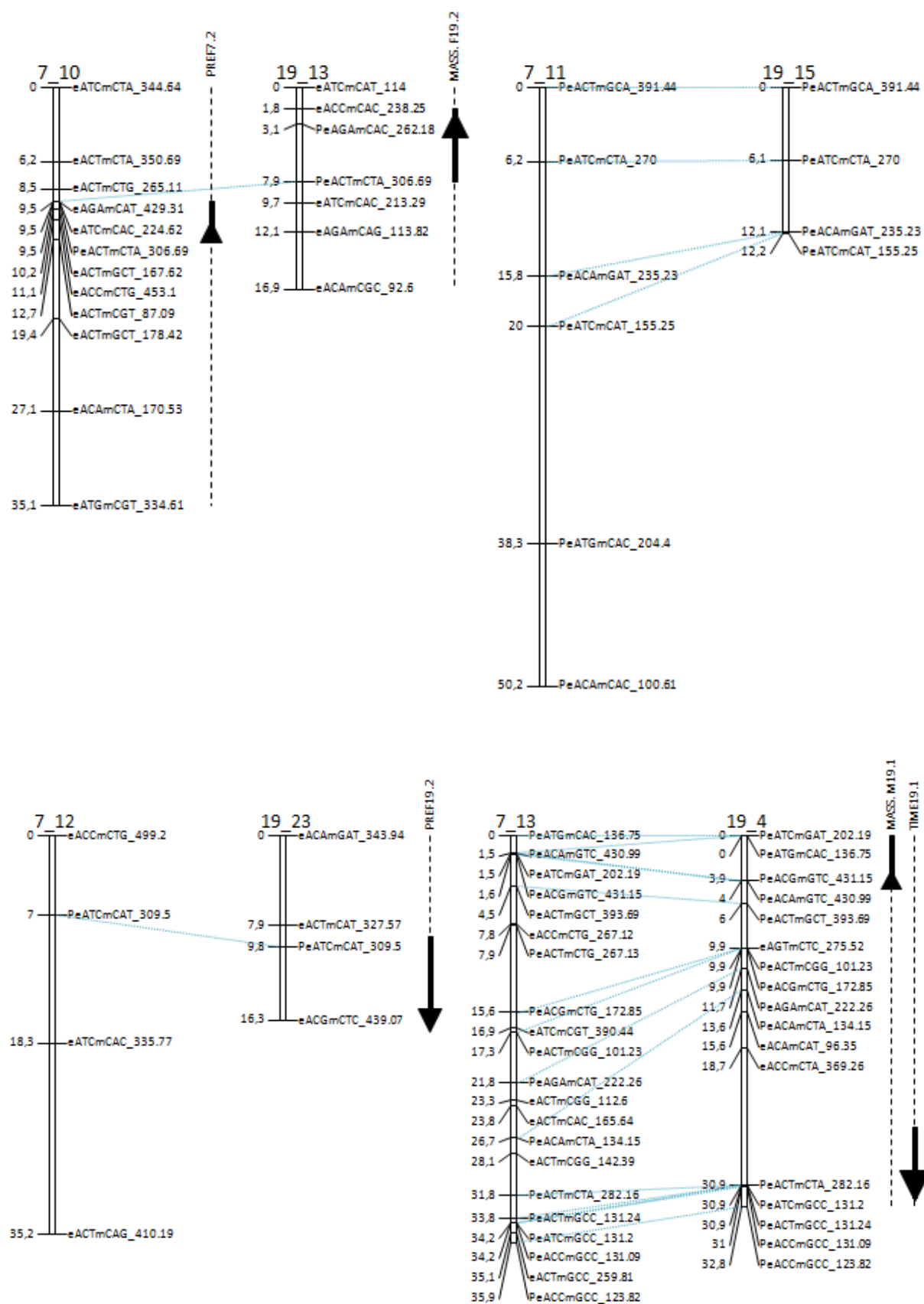


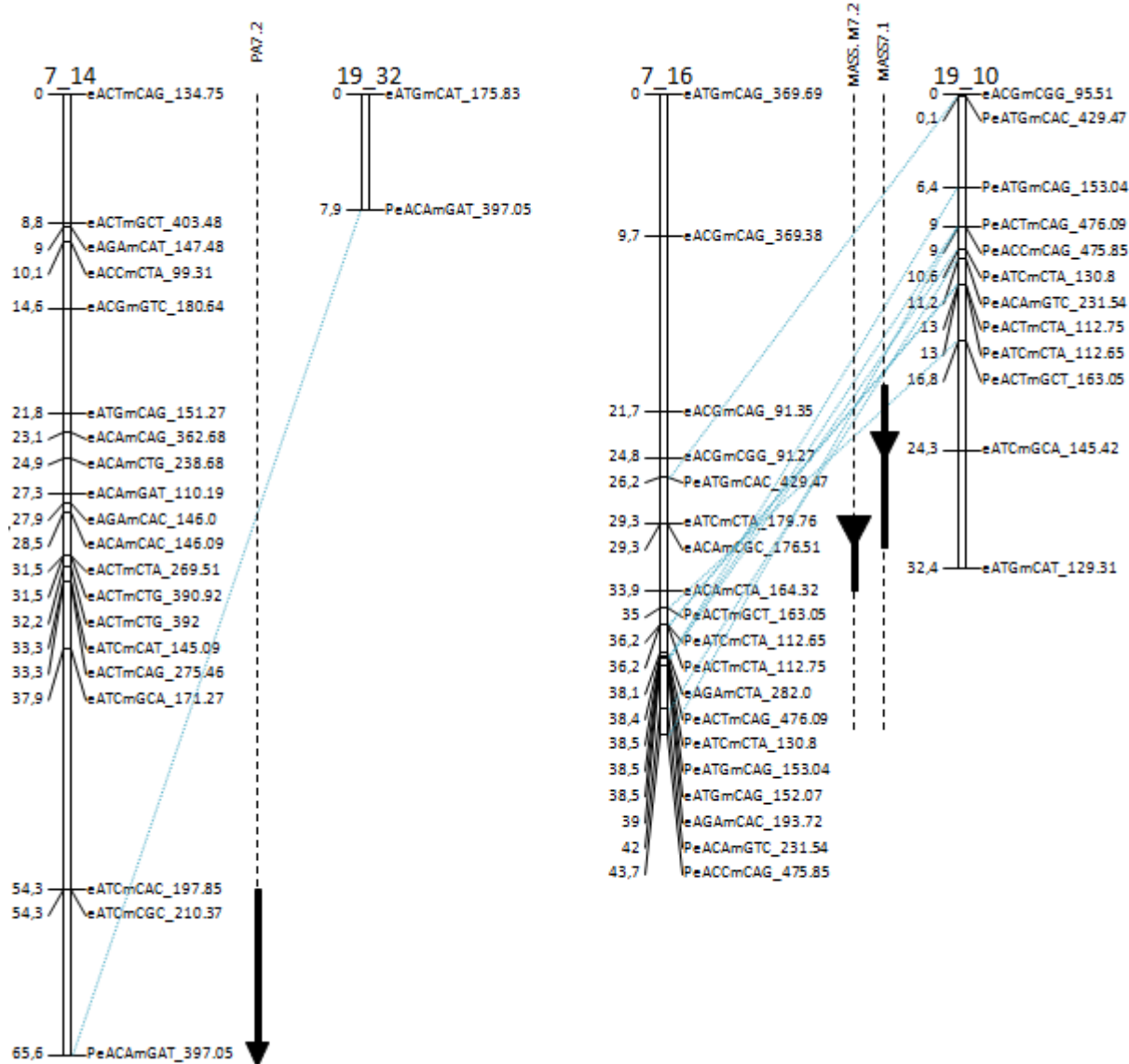


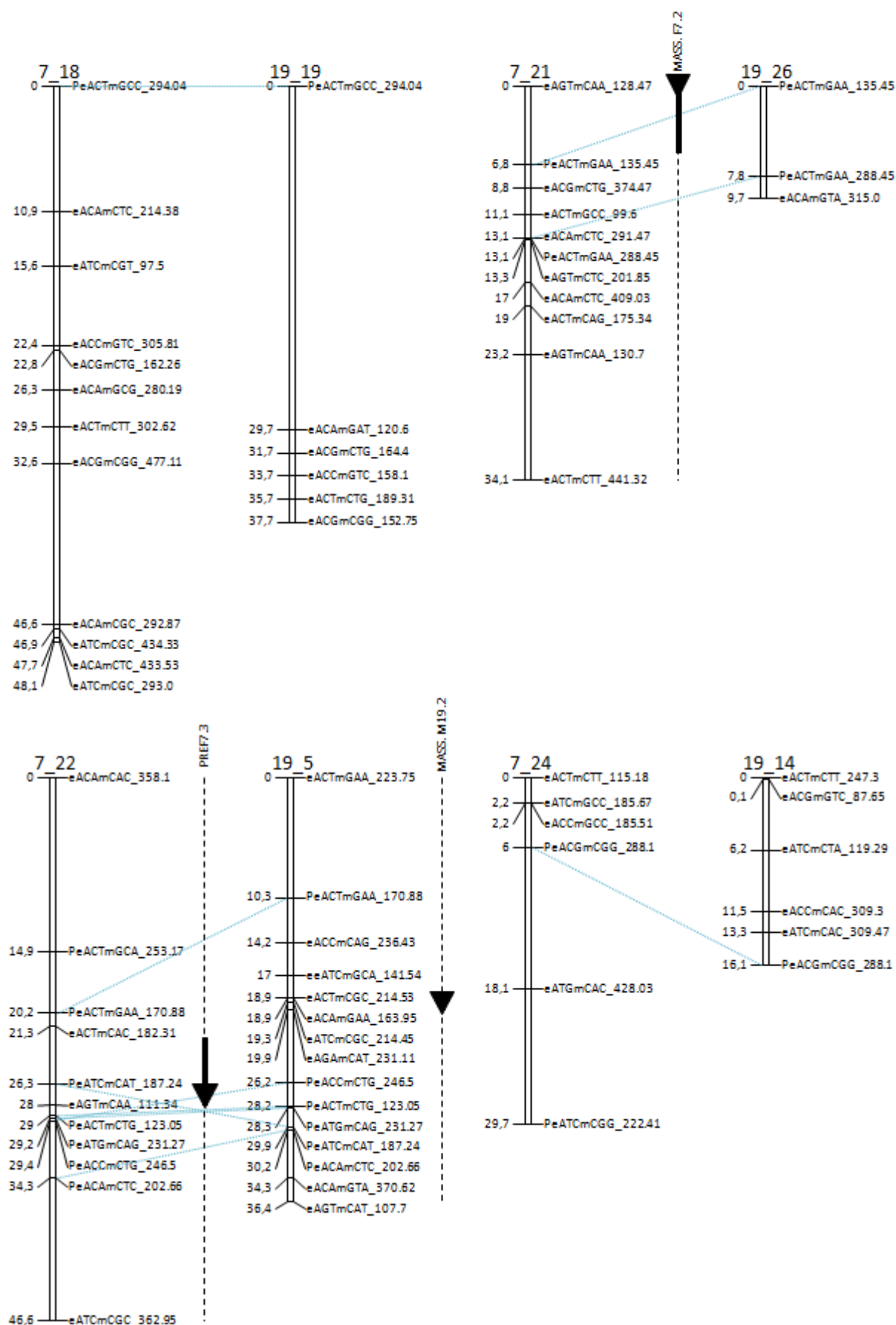


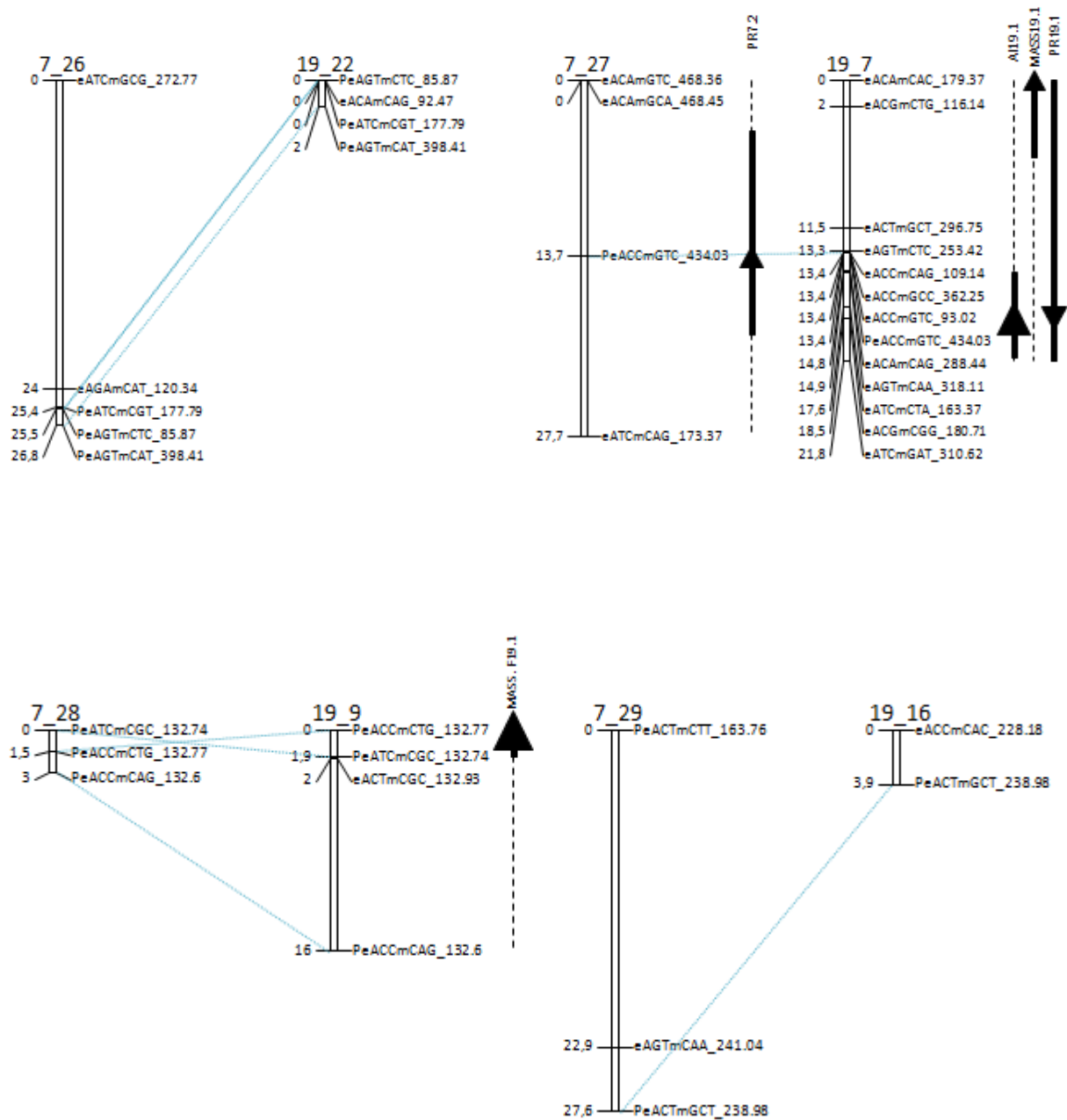


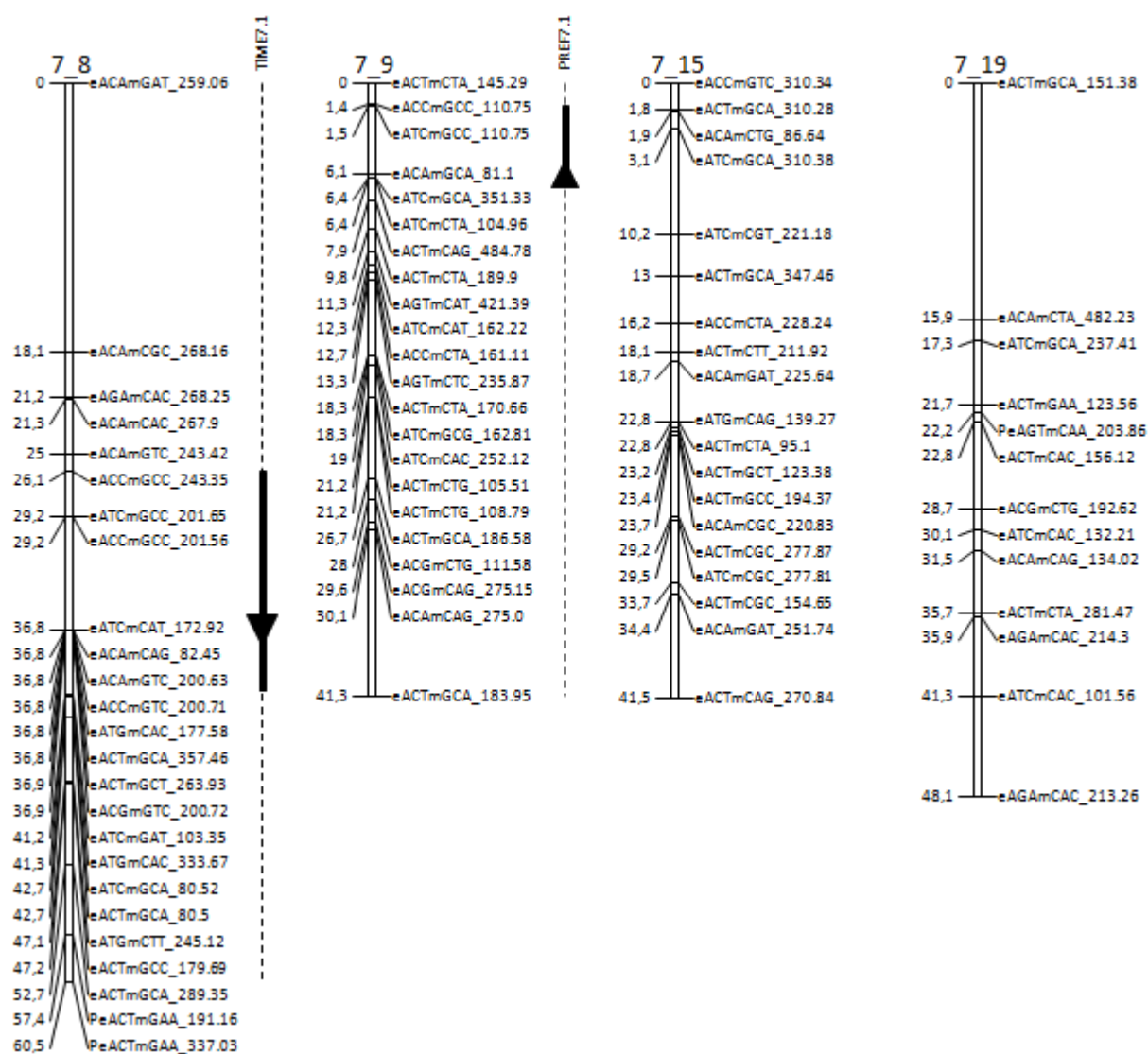


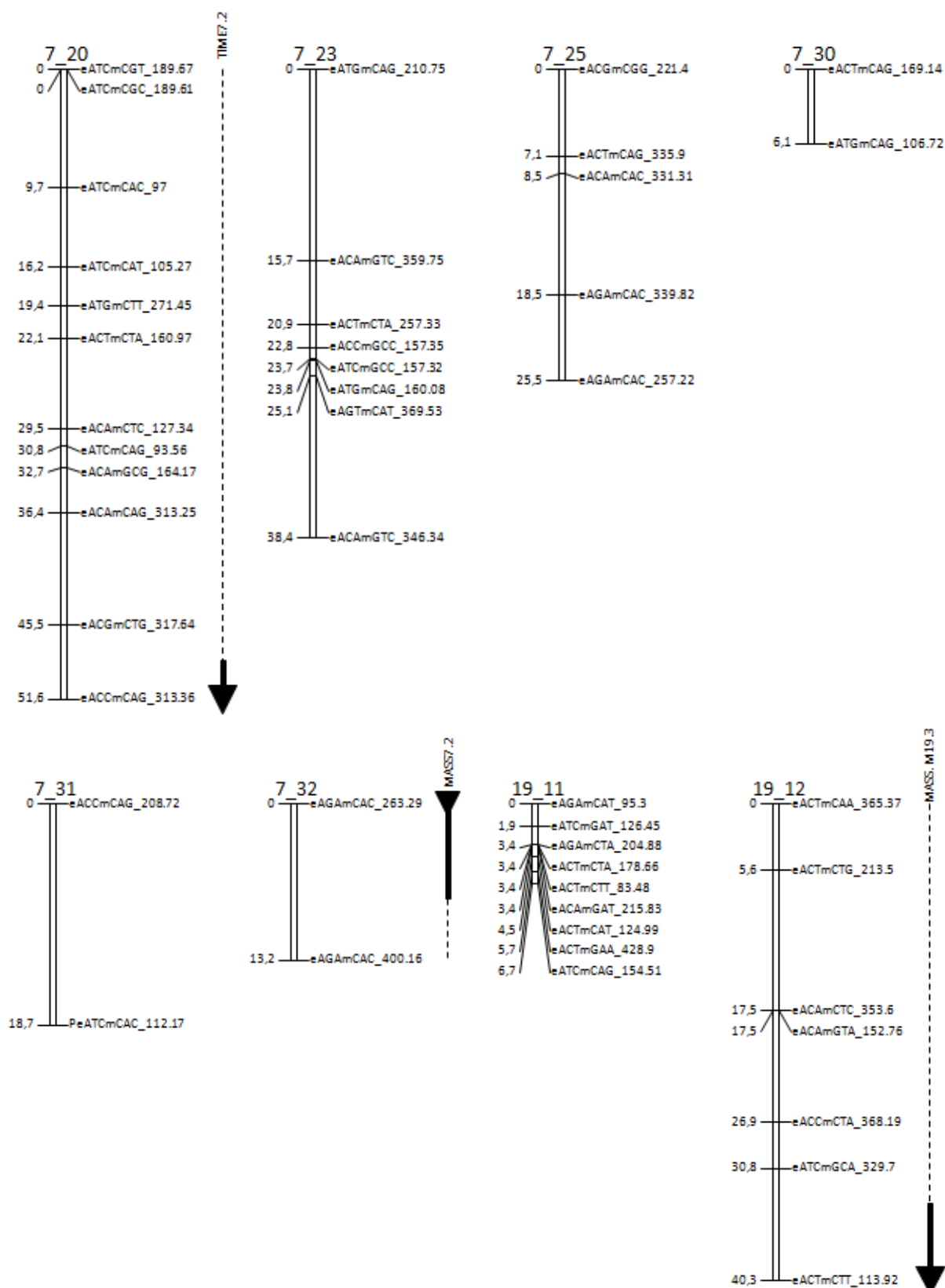


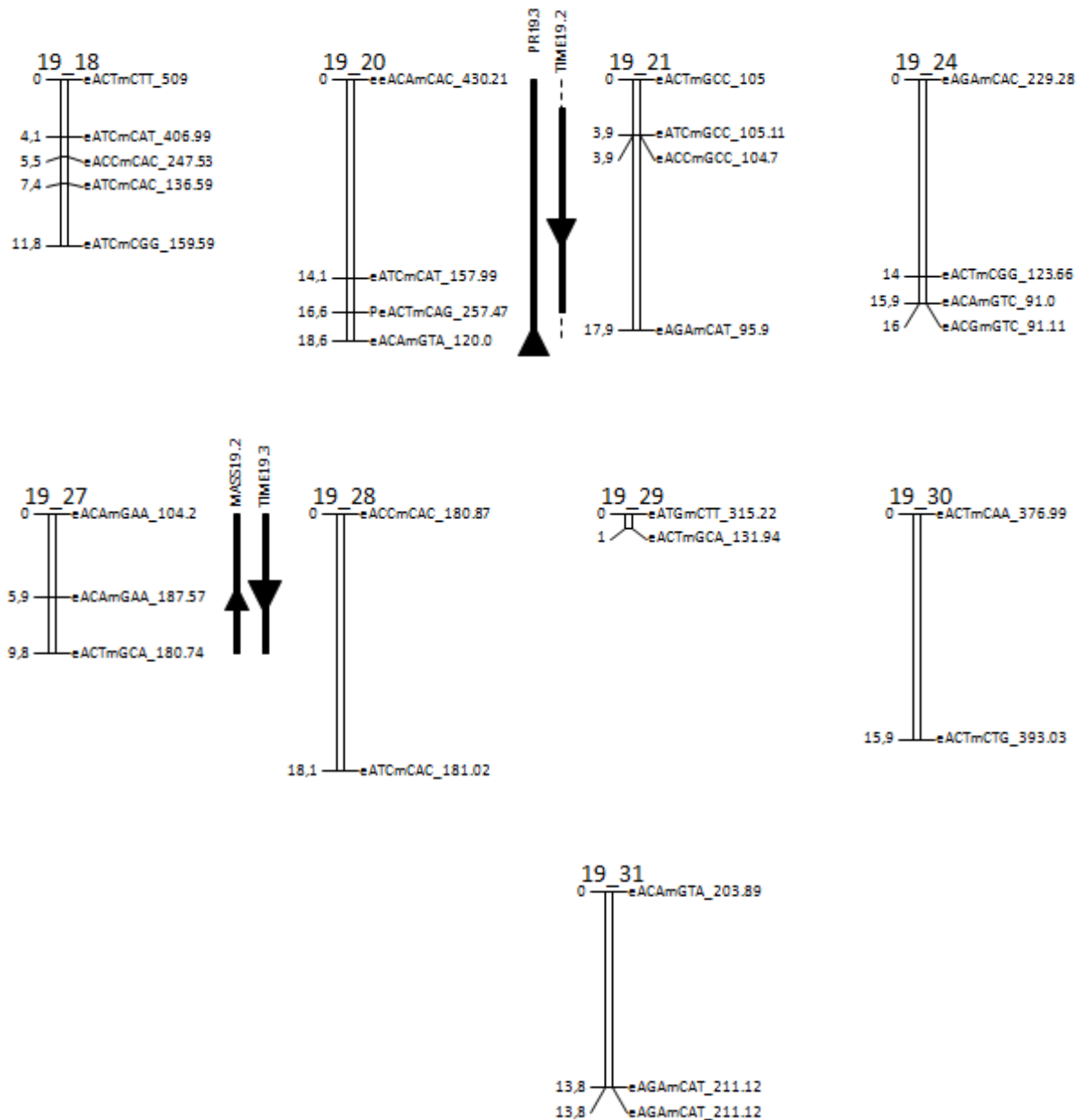












Appendix 1: QTL map for developmental and sexual traits. All linkage groups are represented, and the blue dotted lines are the connector lines between common markers in Xt7 and Xt19. The black triangle indicates the position of the QTL ; its size, the LOD value and its orientation, the estimated additive effect. The black line indicates the confidence interval of the respective QTL. Linkage group identities (brood ; linkage group number) are indicated above each graph, and names of QTL traits are shown above the black line. Map distances are in cM, estimated by the Kosambi mapping function.

DISCUSSION GENERALE

De nombreuses études ont été menées afin de mettre en évidence les différents mécanismes agissant lors de la sélection sexuelle (Andersson, 1994; Andersson and Simmons, 2006; Clutton-Brock, 2007,2009). Aussi, lors de cette thèse, j'ai pris le parti d'étudier le processus du choix du partenaire lors de la sélection intersexuelle chez *Achroia grisella*, qui est un papillon présentant une communication acoustique. Pour parvenir à identifier et à déterminer le rôle et l'incidence des différentes informations acoustiques agissant lors de la sélection sexuelle, j'ai dû utiliser plusieurs approches expérimentales. En effet, des approches comportementales, moléculaires ou bien encore de physique acoustique ont été nécessaires lors du déroulement de cette thèse.

Dans un premier temps, l'objectif de cette thèse a été de comprendre de manière précise, le mode d'évaluation par les femelles des signaux mâles et d'observer la variation existante pour ces signaux. L'étude a permis de mettre en évidence : (i) la préférence des femelles *A. grisella* pour des mâles avec des signaux présentant de forts pics d'amplitude et (ii), de montrer la présence de fortes fluctuations au sein de certains chants mâles qui pourraient s'expliquer comme étant une réponse comportementale vis-à-vis du choix femelle (chapitre 1). Dans un second temps, l'objectif a été de déterminer s'il existait des facteurs génétiques qui influencent fortement ces caractères du signal mâle et de la préférence femelle, et si une covariance entre ces derniers existait. L'héritabilité et la variance génétique de ces traits ayant déjà été mises en évidence, des tests comportementaux associés à des analyses moléculaires ont alors été nécessaires pour identifier les bases génétiques associées à ces comportements. Dans le second chapitre (iii) nous avons ainsi déterminé l'architecture génétique de la préférence et du chant, (iv) sans pour autant identifier une covariance génétique entre ces traits, dû à une liaison physique. Une grande variété de questions évolutives a ainsi été abordée au cours de ma thèse et les résultats obtenus soulèvent plusieurs questions fondamentales.

Nous sommes en mesure de se demander tout d'abord, comment les animaux évaluent les signaux dans leur ensemble et comment leur émission est-elle contrôlée. En outre, afin de mieux comprendre l'évolution de la communication animale dans le cadre de la sélection sexuelle, il sera nécessaire de trouver une ou des origine(s) significative(s), conduisant à la présence d'une covariance génétique entre les traits mâles et femelles, bien que celle-ci puisse être absente dans diverses situations.

I - IMPORTANCE DES SIGNAUX

L'étude et l'analyse des signaux et des mécanismes de choix intervenant lors de la sélection sexuelle peuvent être réalisées plus facilement chez des espèces acoustiques. En effet, en travaillant avec ces différentes espèces, il nous est possible d'enregistrer le chant des individus en laboratoire ou sur le terrain et par la suite, de les analyser et de les modifier à souhait. En utilisant des signaux modifiés artificiels, il a alors été faisable dans le cadre de diverses expériences de déterminer les réponses spécifiques pour ces différents signaux. Je me suis donc tout d'abord intéressé à caractériser le choix du partenaire sexuel chez *Achroia grisella* et j'ai montré, que pour cette espèce, les femelles évaluent le signal mâle de façon très fine et qu'elles ne se focalisent pas uniquement sur la puissance acoustique en général (Greig and Greenfield, 2004). Ceci se justifie essentiellement par la mise en évidence d'une préférence générale des femelles pour des signaux présentant de forts pics d'intensité et, par conséquent, ayant de fortes fluctuations d'intensité, même si je n'ai pas testé ici des fluctuations *per se*. Différents facteurs sont donc pris en compte par les femelles lors du choix du partenaire, à savoir une préférence pour une plus forte puissance acoustique (rythme X amplitude) mais aussi pour des signaux avec des variations d'intensité. L'évaluation des signaux est donc un phénomène complexe qui nécessite une analyse simultanée de ces différents facteurs qui auront un poids plus ou moins important dans la prise de décision. En effet, une femelle pourra se focaliser sur certains traits du signal mâle qui ne seront pas les mêmes pour une autre et le choix effectué fait donc suite à une intégration de tous ces traits. De plus, des facteurs biotiques et abiotiques vont avoir une forte influence sur le choix femelle ainsi que sur la transmission des signaux mâles. En raison de la complexité des signaux tant au niveau de leurs caractéristiques qu'au niveau de leur interprétation, les individus émetteurs vont par conséquent mettre en place différentes stratégies. Dans notre cas précis où les femelles semblent préférer des signaux avec une amplitude qui fluctue et une forte puissance, les mâles devraient avoir tendance à chanter de cette manière mais une corrélation négative entre l'amplitude et la variation de celle-ci est observée (Limousin and Greenfield, 2009). Par conséquent, différentes stratégies semblent être optimales et vont être adoptées par les mâles chez cette espèce. Ces insectes ne se nourrissant pas à l'état adulte, le poids à l'émergence va refléter en quelque sorte la condition de l'individu et sera un indice de

l'énergie qu'il pourra engager dans sa propre reproduction. Il est alors évident qu'un individu avec une bonne condition aura tendance à chanter de façon intense. D'un autre côté, des individus ayant une moins bonne condition vont avoir tendance à chanter avec une plus faible intensité et seront inévitablement moins compétitifs pour attirer des femelles. Pour compenser ce manque d'attractivité, ces mâles peuvent donc présenter des variations d'intensité lors de l'émission de leur signal et potentiellement augmenter leur chance d'attirer des femelles. Cependant, en raison de l'absence de corrélation entre le poids et l'intensité du signal dans notre étude, il pourrait être judicieux d'observer attentivement chaque individu et d'identifier s'ils existent des mâles qui chantent fortement en dépit de leur faible poids, ce qui conduirait dans ce cas à revoir l'idée que le poids des mâles reflète leur condition et leur aptitude à chanter de façon intense. Par ailleurs, il pourra être intéressant de se demander si la stratégie adoptée par des mâles ayant une moins bonne condition, et qui consiste à présenter une variation d'intensité afin d'émettre quelques forts pulses d'intensité susceptibles d'être détectés par les femelles, est un phénomène contrôlé et donc volontaire ou si ce sont des contraintes mécaniques ou physiologiques qui sont à l'origine de la variation d'intensité. Une étude concernant la mécanique d'émission du signal pourrait permettre de mieux appréhender ce phénomène. Ainsi, des enregistrements simultanés audio et vidéo d'un mâle en train d'émettre un signal ultrasonique afin d'attirer les femelles pourraient être réalisés. De plus, à l'aide d'une caméra vidéo à haute vitesse, il sera alors possible d'observer et de décomposer le mouvement des ailes. Ces diverses études assez simples à mettre en œuvre, pourraient nous permettre de savoir s'il existe ou non des contraintes mécaniques au niveau du battement alaire. Par ailleurs, on pourrait tenter de mettre en évidence la présence de l'intervalle asynchrone, qui est une caractéristique majeure du signal mâle analysée par les femelles lors de leur choix, et déterminer l'origine de sa durée. Enfin, en regardant finement le mouvement alaire nous pourrions être en mesure de comprendre la différence d'intensité présente au sein d'une même paire de pulses. L'émission d'un signal est en effet régulée par des caractéristiques propres à l'individu mais sa perception sera aussi influencée par des caractéristiques environnementales. Chez *Achroia grisella*, le signal joue un rôle indispensable dans le choix du partenaire et on observe que les femelles procèdent à une évaluation complexe et minutieuse des différents signaux. Ainsi leur analyse des signaux se base sur différentes fenêtres temporelles et nous avons pu observer que la taille minimale de ces fenêtres était d'environ 10 ms (Limousin and Greenfield, 2009). Les femelles semblent ainsi discriminer de manière assez fine les variations d'amplitude du signal mais il serait

également intéressant de comprendre et de mettre en évidence leur niveau de discrimination du rythme du signal. En effet, les mâles de l'espèce étudiée ont une reproduction de type leks et donc lorsqu'une femelle arrive au sein d'un lek, elle va percevoir de façon simultanée de multiples chants et va devoir analyser un grand nombre de paires de pulses. Montrant une préférence pour des signaux présentant un rythme rapide, il serait intéressant de déterminer comment les femelles arrivent à repérer le rythme précis d'un mâle parmi la multitude de paires de pulses qu'elle entend. Les femelles sont donc tout d'abord attirées par le lek en général (présence d'un grand nombre de mâles et par conséquent le signal perçu aura une forte puissance acoustique), puis une fois au sein de ce lek, elles vont devoir décomposer la perception totale du signal afin d'identifier chaque individu et pouvoir choisir l'un d'entre eux. En réalisant des expériences semblables à celles réalisées lors de la première partie de cette thèse mais en modifiant cette fois-ci le rythme des paires de pulses et non pas l'amplitude des paires de pulses, nous pourrions essayer de mettre en évidence le processus avec lequel les femelles intègrent le rythme du mâle. Par exemple, est-ce que pour choisir un mâle, les femelles se focalisent sur un rythme constant assez élevé ou préfèrent-elles un signal avec un rythme moyen plus lent, mais présentant durant un court instant un rythme très important. Nous pourrions ainsi déterminer une fenêtre temporelle moyenne permettant à la femelle d'analyser le rythme du chant d'un mâle. Les mâles présentent donc des variations au niveau de leurs signaux respectifs et les femelles ont des préférences différentes pour un même chant. Au niveau de la reconnaissance intersexuelle, le choix du partenaire implique ici une évaluation fine des signaux ultrasoniques émis. Cependant, il est impossible chez *Achroia grisella* d'associer cette émission d'ultrasons dans le but d'une reconnaissance interspécifique, car *Achroia grisella* n'a pas d'espèces proches utilisant également des ultrasons. La communication ici va seulement avoir pour but de permettre la rencontre des partenaires alors que chez d'autres animaux comme les grenouilles par exemple, l'utilisation des signaux acoustiques va permettre une reconnaissance interspécifique (Ryan, 1991).

Par ailleurs, il pourrait être judicieux d'utiliser les mêmes approches comportementales chez d'autres espèces de Lépidoptère utilisant des ultrasons et qui présentent un intérêt économique en ayant un impact au niveau des cultures ou bien encore sur la survie d'autres espèces animales. Très peu d'espèces de Pyralidae semblent utiliser des ultrasons afin de choisir leur partenaire (Conner, 1999). Parmi ces espèces, on note l'existence de la fausse teigne de la cire *Galleria mellonella* qui est une espèce faisant partie de la même

sous-famille (Galleriinae) qu'*Achroia grisella* et qui peut poser des problèmes pour les apiculteurs car les larves se nourrissent des rayons de cire des ruches et de la pyrale du riz *Corcyra cephalonica* où les larves se nourrissent de semences incluant les céréales (Trematerra, 1997). Pour les autres espèces de Lépidoptère où l'on observe la présence d'ultrasons, ces dernières sont le plus souvent associées à l'émission de phéromones. Ici, les signaux permettant la reconnaissance entre partenaires sont donc multiples et il pourrait être utile de mieux comprendre le rôle et l'impact exact de la communication acoustique par rapport à la communication chimique en étudiant indépendamment les différents signaux mis en jeu, en particulier chez des espèces ravageuses comme la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. On a tout de même depuis les années 1990, découvert d'autres pyrales acoustiques, même si chez ces dernières, les sons émis sont impliqués dans le signal de cour et interviennent donc à courte distance. Ainsi, des chercheurs se sont intéressés à comprendre la variation des ultrasons émis chez trois espèces de pyrale très proches (Takanashi et al., 2010) et ont montré l'importance de ces signaux lors de l'accouplement. Cependant, aucune étude ne s'est focalisée sur la préférence des femelles en présence de différents signaux. Une meilleure compréhension du choix femelle chez ces espèces, permettrait pourquoi pas de mettre en place des dispositifs empêchant les femelles de détecter le chant des mâles et ainsi empêcher leur reproduction, même si les signaux acoustiques ne représentent pas leur unique moyen de communication. En effet, l'utilisation de phéromones sexuelles femelles pourrait être plus efficace car elle provoque une confusion chimique en empêchant les mâles de repérer les femelles à plus longue distance, et avant que ces derniers n'émettent leurs signaux ultrasoniques.

II – SIGNAUX et PREFERENCES

Comme on a pu le voir, la communication acoustique joue un rôle primordial chez *Achroia grisella* mais encore faut-il que les signaux émis par les mâles coïncident avec les préférences des femelles. En effet, afin que le processus de sélection sexuelle fonctionne selon le mécanisme de Fisher, on attend la présence d'une covariance entre les gènes influençant les caractéristiques des signaux et les propriétés de préférence est attendue. Différents phénomènes peuvent expliquer cette covariance. Pour commencer, il est possible que les allèles responsables de la production par les mâles de signaux exagérés aient tendance à être associés préférentiellement à des allèles responsables des seuils de réception à ces signaux élevés chez les femelles. Cette liaison de déséquilibre, peut accélérer l'évolution des deux traits et les maintenir à des niveaux exagérés. La covariance génétique peut également être due à la position proche des gènes, liés aux traits exagérés chez les signaux mâles et aux traits de préférence chez les femelles, dans une même région chromosomique, ou bien encore à l'action pléiotropique d'un gène sur l'expression de ces deux traits. La deuxième partie de cette thèse a essayé de répondre à la question majeure concernant l'existence ou non d'une covariance entre les traits du signal et ceux de la préférence, et de déterminer son origine si elle existe. Pour ce faire nous avons alors dans un premier temps recherché les facteurs génétiques de ces différents traits. L'atout de cette thèse réside ici dans le fait qu'une quantification de la préférence femelle via l'analyse de certains traits associés à cette préférence a été réalisée parallèlement à l'analyse des traits mâles. La réalisation d'une analyse QTL des sites génomiques qui influencent les traits du signal et ceux de la préférence est peu fréquente surtout lorsque l'on s'attache à expliquer les mécanismes de sélection sexuelle. En effet, la majorité des études s'emploient, par le biais de ces analyses QTL, à expliquer les phénomènes de spéciation entre espèces proches (Ellison et al., 2011; Shaw et al., 2007; Etges et al., 2007; Shaw and Parsons, 2002) où dans ces cas précis on étudie les phénomènes impliqués dans la reconnaissance de l'espèce avec comme attente le fait que l'évaluation des signaux soit ici plus simple et plus rapide. De même, d'autres études ont cherché à associer et à justifier la présence de traits extravagants aux traits d'histoire de vie des individus (Wright et al., 2008). Par ailleurs, trouver l'origine de la covariance comme nous avons essayé de le faire est encore quelque chose de peu commun afin de décrire au

mieux les processus agissant lors de la sélection sexuelle. La méthodologie employée, a permis tout d'abord grâce à l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs, de localiser de façon très précise les différents QTLs identifiés. En dépit de l'obtention de cette carte génétique, l'origine de la covariance n'a pas pu être expliquée par l'existence de co-localisation entre des traits associés à la préférence femelle et au signal mâle. L'absence de covariance génétique additive est justifiée ici par le fait de ne pas trouver de liaisons physiques entre les 2 types de traits. Plusieurs raisons valables peuvent affecter et justifier les résultats obtenus, c'est-à-dire l'absence de covariance, dans notre étude et dans bien d'autres (Ritchie et al., 2005; Zhou et al., 2011), en commençant tout d'abord par la complexité du phénotypage. Malgré une connaissance précise de la biologie de l'espèce étudiée, il est souvent difficile d'analyser correctement la préférence femelle. En effet, les femelles intègrent une multitude de traits du signal mâle et c'est une analyse simultanée de ces différents paramètres qui va conduire une femelle à choisir tel ou tel signal. Or, il est très délicat et difficile d'analyser en même temps la préférence pour chaque trait du signal mâle et nous sommes donc dans l'obligation de choisir des tests rapides et les plus représentatifs de la préférence chez les femelles. De plus, il faut toujours garder en mémoire que chaque individu, lors du phénotypage, aura une physiologie différente ainsi qu'une personnalité différente qui pourra affecter sa propre fitness (Smith and Blumstein, 2008) et par conséquent influencer sur le signal en ce qui concerne les mâles et sur le comportement de choix pour ce qui est des femelles. En dépit de la difficulté à trouver les tests les plus judicieux afin de mettre en évidence une covariance génétique entre les traits sexuels mâles et femelles, d'autres phénomènes peuvent justifier le maintien à l'équilibre des traits mâles et femelles agissant lors du processus de sélection sexuelle. Parmi tous ces phénomènes, les interactions génotype - environnement (Greenfield and Rodriguez, 2004), peuvent ainsi expliquer la présence de variations pour les traits sexuels mâles et femelles. Le processus de Fisher pourra alors être maintenu à un état stable, conduisant à une faible évolution des traits sexuels et donc à une sélection faible pour des traits exagérés et extravagants. En raison des changements de l'environnement, le déséquilibre de liaison entre les traits mâles et femelles dû à un accouplement non aléatoire peut cesser et expliquer l'absence de covariance.

Enfin, d'autres approches en plein essor à l'heure actuelle, mais plus coûteuse, comme le séquençage à haut débit, donneraient en premier lieu l'opportunité d'avoir la séquence complète du génome. L'acquisition de ces données, associée à une approche « gène

candidat » par exemple, permettrait par ailleurs de tester si des gènes spécifiques, qui ont des fonctions connues chez les Lépidoptères ou d'autres insectes, sont responsables de certains traits du signal et de la préférence. L'émergence de nouvelles approches basées principalement sur l'utilisation d'outils moléculaires, va pouvoir ainsi au cours des prochaines années faciliter la compréhension et la mise en évidence de l'évolution des comportements sexuels chez *Achroia grisella*, et peut être permettre une meilleure détermination des facteurs génétiques qui pourraient être responsables de la covariance des traits sexuels lorsque celle-ci existera. Finalement, lors de la sélection sexuelle, une multitude de phénomènes va donc intervenir entre les protagonistes et ce sont les variations des signaux acoustiques qui vont permettre d'expliquer la persistance et l'évolution des choix des femelles.

III - CONCLUSION

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse soulignent l'importance de s'intéresser à des questions relatives aux choix sexuels comme un ensemble cohérent. L'étude des comportements à travers l'analyse seule des informations utilisées lors des prises de décision n'est pas suffisante pour pouvoir conclure sur les différents processus évolutifs associés au choix des partenaires. Une compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents est, comme on a pu le voir, un complément indispensable afin de tester et de confirmer ou d'infirmer les différentes théories associées aux processus de la sélection sexuelle.

Cependant se contenter d'associer comportement et génétique n'est pas suffisant pour répondre à toutes ces questions. En effet, l'émission d'un signal de cour chez *A. grisella* ou bien encore le choix associé aux différents signaux vont être différents non seulement selon l'état physiologique de chaque individu mais aussi selon leur personnalité. Il est alors judicieux et indispensable de considérer l'individu dans son intégralité.

Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué précédemment, des études fines sur le mécanisme de production du son permettrait par exemple de mieux comprendre la présence d'une variation intra et inter-individuelle chez les mâles, car pour le moment il est très difficile de dire si cette variation est due à un contrôle volontaire ou non. De même, une analyse neuroéthologique lors des tests de choix des femelles permettrait d'associer le rôle de certains systèmes fonctionnels à la prise de décision effectuée par les femelles pour tel ou tel signal. Une première approche a consisté à déterminer la transmission du signal jusqu'au tympan (Rodriguez et al., 2005) afin d'améliorer les connaissances sur l'évaluation par les femelles des différentes propriétés temporelles du chant émis par les mâles. Cette étude s'est focalisée sur le fonctionnement de ces tympan mais il serait utile par l'intermédiaire d'une investigation plus large et complexe de déterminer et de pouvoir mettre en évidence l'existence d'un réseau neuronal impliqué dans la prise de décision de la femelle suite à la réception d'un signal.

Un grand nombre de nouveaux projets peuvent être ainsi menés en laboratoire afin de répondre à ces nombreuses questions, cependant des études de terrain semblent indispensables pour conforter nos connaissances concernant la biologie de l'espèce. En effet, en milieu naturel, très peu d'observations de leks chez *Achroia grisella* ont été décrites (Greenfield, observations personnelles). L'une des raisons principales à ce manque d'observations provient de la période de rencontre entre les partenaires qui se déroulent dès le début de la scotophase. Cependant, d'après ces différentes observations, les leks comprennent en moyenne 5 à 6 mâles, et la femelle semble bien évaluer ces différents individus afin d'en choisir un. Il pourrait dans un premier temps, être judicieux de confirmer les préférences des femelles en laboratoire, où les conditions environnementales sont contrôlées, pour des chants mâles avec certaines caractéristiques (forte intensité, rythme élevé, long intervalle asynchrone), en capturant les différents mâles constituant le lek et en analysant leurs signaux. Le mâle choisi par la femelle devrait ainsi avoir ces caractéristiques préférentielles. De plus, des études de terrain pourraient mener à une meilleure compréhension des mécanismes de regroupement des mâles pour former les leks. Les interactions entre individus mâles (combats, évitements) pourront être ici mieux prises en compte dans ces milieux libres, car la densité des individus pourra être variable et cela nous donnera une idée sur la répartition spatiale des mâles au lek. De même, à une plus grande échelle, des études comportementales en milieu naturel nous donneraient une meilleure compréhension des multiples interactions biotiques existantes au niveau individuel ainsi qu'au niveau des différentes populations étudiées. *Achroia grisella* peut par exemple avoir comme prédateur des chauves-souris, qui vont avoir un impact sur le comportement reproducteur des mâles et des femelles (Greenfield and Weber, 2000; Greenfield and Baker, 2003; Rodriguez and Greenfield, 2004; Greig and Greenfield, 2004; Greenfield and Hohendorf, 2009; Alem and Greenfield, 2010; Lafaille et al., 2010; Brunel-Pons et al., 2011). Il est par conséquent indispensable de pouvoir observer in situ ces différentes interactions pour mieux appréhender les différentes stratégies mises en place par les mâles et les femelles pour optimiser les chances et la qualité de leur reproduction respective.

Par ailleurs, bien que la qualité du signal soit primordiale pour le mâle afin qu'il puisse être choisi par une femelle, aucune étude ne s'est pour l'instant penchée sur la possibilité d'une corrélation entre la qualité du chant et la qualité reproductrice de l'individu. Chez *Achroia grisella*, les femelles choisissent leur partenaire sur des bases acoustiques, sans

recevoir de bénéfices directs, et d'après la théorie de Fisher des bénéfices génétiques sont attendus en raison du maintien du choix femelle. Cependant, rien ne dit qu'en choisissant de s'accoupler avec un mâle donné pour obtenir des « fils sexy » ou « des bons gènes » pour ses descendants, la femelle va pouvoir engendrer un grand nombre de descendants. En effet, s'il n'y a pas de corrélation positive entre la qualité du signal et celle du sperme, la femelle risque d'avoir peu de descendants et donc pas d'avantages évolutifs (fitness). Dans un premier temps, une analyse de la quantité et de la qualité (mobilité, vitalité) du sperme pourrait donner la possibilité de déterminer des corrélations positives ou négatives entre les différents paramètres du signal mâle, et la quantité ainsi que la qualité de sperme. Dans un second temps, un comptage du nombre d'œufs pondus, lorsqu'il est possible d'en obtenir, puis du nombre de descendants viables permettraient d'associer la qualité du chant du mâle à sa valeur sélective. Pour se faire, il faudra bien entendu prendre en compte le poids de la femelle car la charge en œufs est probablement fortement associée au poids de la femelle (Walker and Allen, 2010). De plus, il faudra prendre soin de fournir un milieu de développement identique et en quantité suffisante pour obtenir de façon contrôlée des descendants qui représentent la valeur sélective réelle de chaque mâle étudié. Avec la mise en place de ces futures expériences pour déterminer si des chants attractifs semblent être un indice fiable concernant la capacité reproductrice des mâles présentant ce type de chant, on pourrait ainsi appuyer et conforter la théorie de Fisher et celle des « bons gènes », en expliquant la présence d'un choix femelle pour l'obtention de bénéfices génétiques.

Cette thèse a permis de montrer que l'association et l'utilisation de plusieurs méthodologies étaient nécessaires pour investiguer et comprendre au mieux des phénomènes complexes tels que le processus de sélection sexuelle que nous avons pris le parti d'étudier chez *Achroia grisella*. Des analyses comportementales fines ont été indispensables, me permettant ainsi de dissocier et de comprendre les différents mécanismes agissant simultanément ou non lors ce processus de sélection sexuelle. Par ailleurs, l'usage des outils moléculaires m'a également permis de renforcer la portée des approches comportementales, car les résultats observés ici ont étayé les différentes observations et donné de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes de coévolution entre les signaux masculins et les préférences femelles. De plus, la compréhension de ces différents mécanismes repose essentiellement sur le niveau de connaissance du comportement reproducteur des individus. Ainsi, s'intéresser à l'écologie comportementale, et plus

particulièrement aux mécanismes de reproduction, nécessite d'utiliser des approches diverses afin de répondre aux grandes théories du monde vivant. Par ailleurs, j'ai pu montrer que l'utilisation d'une espèce comme *Achroia grisella*, pouvait tout de même présenter de multiples atouts dans le cadre d'une étude sur la sélection sexuelle. Finalement, de part la diversité présente dans la nature, mon étude montre qu'il peut être judicieux d'utiliser et d'étudier des espèces, autres que des espèces modèles, pour mieux répondre à notre questionnement constant sur l'évolution du monde vivant.

BIBLIOGRAPHIE

- Alatalo, R. V., Glynn, D. & Lundberg, A. (1990). Singing rate and female attraction in the pied flycatcher. *Animal Behaviour*, **39**, 601-603.
- Alem, S. & Greenfield, M. D. (2010). Economics of mate choice at leks: do female waxmoths pay costs for indirect genetic benefits? *Behavioral Ecology*, **21**, 615-625.
- Alexander, R. D. (1962). Evolutionary change in cricket acoustical communication. *Evolution*, **16**, 443-467.
- Andersson, M. (1986). Evolution of condition-dependent sex ornaments and mating preferences: sexual selection based on viability differences. *Evolution*, **40**, 804-816.
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 624 p.
- Andersson, M. & Iwasa, Y. (1996). Sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, A53-A58.
- Andersson, M. & Simmons, L. W. (2006). Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**, 296-302.
- Bakker, T. C. M. (1993). Positive genetic correlation between female preference and preferred male ornament in sticklebacks. *Nature*, **363**, 255-257.
- Bakker, T. C. M. & Pomiankowski, A. (1995). The genetic basis of female mate preferences. *Journal of Evolutionary Biology*, **8**, 129-171.
- Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, **2**, 349-368.
- Beavis, W. D. (1998). QTL analyses: power, precision, and accuracy. In *Molecular Dissection of Complex Traits* (ed. by A. H. Paterson), pp. 145-162. CRC Press, New York.
- Boake, C. R. B. (1991). Coevolution of senders and receivers of sexual signals: genetic coupling and genetic correlations. *Trends in Ecology and Evolution*, **6**, 225-227.
- Borgia, G. (1979). Sexual selection and the evolution of mating systems. In *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects* (ed. by M. Blum & N. Blum), pp. 19-80. Academic Press, New York.

- Borgia, G. (1985). Bower quality, number of decorations and mating success of male satin bowerbirds (*Ptilonorhynchus violaceus*): an experimental analysis. *Animal Behaviour*, **33**, 266-271.
- Bonduriansky, R. (2001). The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, **76**, 305-339.
- Bradbury, J. W. (1981). The evolution of leks. In *Natural Selection and Social Behavior* (ed. by R. D. Alexander & D. W. Tinkle), pp. 138-169. Chiron Press, New York.
- Bradbury, J. W. (1985). Contrasts between insects and vertebrates in the evolution of male display, female choice and lek mating. *Fortschritte der Zoologie*, **31**, 273-289.
- Bradbury, J. W. & Vehrencamp, S. L. (1998). *Principles of Animal Communication*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 917 p.
- Brandt, L. S. E. & Greenfield, M. D. (2004). Condition-dependent traits and the capture of genetic variance in male advertisement song. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 821-828.
- Brandt, L. S. E., Ludwar, B. Ch. & Greenfield, M. D. (2005). Co-occurrence of acceptance thresholds and preference functions in female choice: mate discrimination in the lesser wax moth. *Ethology*, **111**, 609-625.
- Brunel-Pons, O., Alem, S. & Greenfield, M. D. (2011). The complex auditory scene at leks: balancing antipredator behaviour and competitive signaling in an acoustic moth. *Animal Behaviour*, **81**, 231-239.
- Bussière, L. F., Hunt, J., Stolting, K. N., Jennions, M.D. & Brooks, R. (2008). Mate choice for genetic quality when environments vary: suggestions for empirical progress. *Genetica*, **143**, 69-78.
- Butlin, R. K. & Ritchie, M. G. (1989). Genetic coupling in mate recognition systems: what is the evidence? *Biological Journal of the Linnean Society*, **37**, 237-246.
- Churchill, G. A. & Doerge, R. W. (1994). Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. *Genetics*, **138**, 963-971.
- Clutton-Brock, T. (2007). Sexual selection in males and females. *Science*, **318**, 1882-1885.

- Clutton-Brock, T. (2009). Sexual selection in females. *Animal Behaviour*, **77**, 3-11.
- Collins, R. D., Jang, Y., Reinhold, K. & Greenfield, M. D. (1999). Quantitative genetics of ultrasonic advertisement signaling in the lesser waxmoth *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Heredity*, **83**, 644-651.
- Conner, W. E. (1999). 'Un chant d'appel amoureux' : acoustic communication in moths. *The Journal of Experimental Biology*, **202**, 1711-1723.
- Danielson-François, A. M., Kelly, J. K. & Greenfield, M. D. (2006). Genotype $\times$ environment interaction for male attractiveness in an acoustic moth: evidence for plasticity and canalization. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 532-542.
- Danielson-François, A. M., Zhou, Y. & Greenfield, M. D. (2009). Indirect genetic effects and the lek paradox: inter-genotypic competition may strengthen genotype $\times$ environment interactions and conserve genetic variance. *Genetica*, **136**, 27-36.
- David, P., Bjorksten, T., Fowler, K. & Pomiankowski, A. (2000). Condition-dependent signaling of genetic variation in stalk-eyed flies. *Nature*, **406**, 186-188.
- Diamond, J. M. (1991). Borrowed sexual ornaments. *Nature*, **349**, 105.
- Dutky, S. R., Thompson, J. V. & Cantwell, G. E. (1962). A technique for mass rearing the greater wax moth. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **64**, 56-58.
- Ellison, C. K., Wiley, C. & Shaw, K. L. (2011). The genetics of speciation: genes of small effect underlie sexual isolation in the Hawaiian cricket *Laupala*. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**, 1110-1119.
- Emlen, S. T. & Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, **197**, 215-223.
- Etges, W. J., de Oliveira, C. C., Gragg, E., Ortiz-Barrientos, D., Noor, M. A. F. & Ritchie, M. G. (2007). Genetics of incipient speciation in *Drosophila mojavensis*. I. Male courtship song, mating success, and genotype $\times$ environment interactions. *Evolution*, **61**, 1106-1119.
- Ewert, J.-P. (1980). *Neuroethology*. Springer-Verlag, Berlin, 342 p.

- Ewing, A. W. (1989). *Arthropod Bioacoustics: Neurobiology and behaviour*. Cornell University Press, Ithaca, 260 p.
- Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford, 318 p.
- Forrest, T. G. & Raspet, R. (1994). Models of female choice in acoustic communication. *Behavioral Ecology*, **5**, 293-303.
- Gerhardt, H. C. (1988). Acoustic properties used in call recognition by frogs and toads. In *The Evolution of the Amphibian Auditory System* (ed. by B. Fritzsche, M. Rayn, W. Wilczynski, T. Heltherington & W. Walkowiak.), pp 455-483. John Wiley & Sons, New York.
- Gerhardt, H. C. (1994). The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, **25**, 293-324.
- Gerhardt, H. C. & Huber, F. (2002). *Acoustic Communication in Insects and Anurans*. University of Chicago Press, Chicago, 542 p.
- Gerhardt, H. C., Dyson, M.L. & Tanner, S.D. (1996). Dynamic properties of the advertisement calls of gray tree frogs: patterns of variability and female choice. *Behavioral Ecology*, **7**, 7-18.
- Gleason, J. M., Jallon, J. -M., Rouault, J. D. & Ritchie, M. G. (2005). Quantitative trait loci for cuticular hydrocarbons associated with sexual isolation between *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. *Genetics*, **171**, 1789-1798.
- Gray, D. A. (1997). Female house crickets, *Acheta domesticus*, prefer the chirps of large males. *Animal Behaviour*, **54**, 1553-1562.
- Greenfield, M. D. (2002). *Signalers and Receivers: Mechanisms and Evolution of Arthropod Communication*. Oxford University Press, Oxford, 414 p.
- Greenfield, M. D. & Coffelt, J. A. (1983). Reproductive behaviour of the lesser waxmoth, *Achroia grisella* (Pyralidae: Galleriinae): signalling, pair formation, male interactions, and mate guarding. *Behaviour*, **84**, 287-315.

- Greenfield, M. D. & Weber, T. (2000). Evolution of ultrasonic signalling in wax moths: discrimination of ultrasonic mating calls from bat echolocation signals and the exploitation of an anti-predator receiver bias by sexual advertisement. *Ethology Ecology & Evolution*, **12**, 259-279.
- Greenfield, M. D. & Baker, M. (2003). Bat avoidance in non-aerial insects: the silence response of signaling males in an acoustic moth. *Ethology*, **109**, 427-442.
- Greenfield, M. D. & Rodriguez, R. L. (2004). Genotype-environment interaction and the reliability of mating signals. *Animal Behaviour*, **68**, 1461-1468.
- Greenfield, M. D. & Hohendorf, H. (2009). Independence of sexual and anti-predator perceptual functions in an acoustic moth: implications for the receiver bias mechanism in signal evolution. *Ethology*, **115**, 1137-1149.
- Greig, E. I. & Greenfield, M. D. (2004). Sexual selection and predator avoidance in an acoustic moth: discriminating females take fewer risks. *Behaviour*, **141**, 799-815.
- Gwynne, D. T. (1982). Mate selection by female katydids (Orthoptera: Tettigoniidae, *Conocephalus nigropleurum*). *Animal Behaviour*, **30**, 734-738.
- Hamilton, W. D. & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, **218**, 384-387.
- Hasson, O. (1989). Amplifiers and the handicap principle in sexual selection: a different emphasis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **235**, 383-406.
- Hasson, O. (1990). The role of amplifiers in sexual selection: an integration of the amplifying and the Fisherian mechanisms. *Evolutionary Ecology*, **4**, 277-289.
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Liu, Y. -B. & Tabashnik, B. E. (1999). Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 8373-8377.

- Helversen, D. (1997). Acoustic communication and orientation in grasshoppers. In *Orientation and Communication in Arthropods* (ed. by M. Lehrer), pp. 301-341. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Hennig, R. M., Franz, A. & Stumpner, A. (2004). Processing of auditory information in insects. *Microscopy Research and Technique*, **63**, 351-374.
- Hill, G. E. (1990). Female house finches prefer colourful males: sexual selection for a condition-dependent trait. *Animal Behaviour*, **40**, 563-572.
- Hill, G. E. (1991). Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature*, **350**, 337-339.
- Höglund, J. & Alatalo, R. (1995). *Leks*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 248 p.
- Höglund, J., Eriksson, M. & Lindell, L. E. (1990). Females of the lek-breeding great snipe, *Gallinago media*, prefer males with white tails. *Animal Behaviour*, **40**, 23-32.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially-rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**, 65-70.
- Holzer, B., Jacot, A. & Brinkhof, M. W. G. (2003). Condition-dependent signaling affects male sexual attractiveness in field crickets, *Gryllus campestris*. *Behavioral Ecology*, **14**, 353-359.
- Hunter, J. (1837). *Observations on Certain Parts of Animal Oeconomy with Notes by Richard Owen*. Longman, Orme, Brown, Green & Longmans, London, 479 p.
- Ingleby, F. C., Hunt, J. & Hosken D. J. (2010). The role of genotype-by-environment interactions in sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 2031-2045.
- Iwasa, Y., Pomiankowski, A. & Nee, S. (1991). The evolution of costly mate preferences. II. The “handicap” principle. *Evolution*, **45**, 1431-1442.
- Jang, Y. & Greenfield, M. D. (1996). Ultrasonic communication and sexual selection in waxmoths: female choice based on energy and asynchrony of male signals. *Animal Behaviour*, **51**, 1095-1106.

- Jang, Y. & Greenfield, M. D. (1998). Absolute versus relative measurements of sexual selection: assessing the contributions of ultrasonic signal characters to mate attraction in lesser wax moths, *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Evolution*, **52**, 1383-1393.
- Jang, Y., Collins, R. D. & Greenfield, M. D. (1997). Variation and repeatability of ultrasonic sexual advertisement signals in *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Behavior*, **10**, 87-98.
- Jia, F.-Y. & Greenfield, M. D. (1997). When are good genes good? Variable outcomes of female choice in wax moths. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **264**, 1057-1063.
- Jia, F.-Y., Greenfield, M. D. & Collins, R. D. (2000). Genetic variance of sexually selected traits in waxmoths: maintenance by genotype X environment interaction. *Evolution*, **54**, 953-967.
- Jia, F.-Y., Greenfield, M. D. & Collins, R. D. (2001). Ultrasonic signal competition among male wax moths. *Journal of Insect Behavior*, **14**, 19-33.
- Johnstone, R.A. (1995). Sexual selection, honest advertisement and the handicap principle: reviewing the evidence. *Biological Reviews*, **70**, 1-65.
- Johnstone, R.A. (1997). The evolution of animal signals. In *Behavioral Ecology: An Evolutionary Approach*. Fourth Edition. (ed. by J. R. Krebs & N. B. Davies), pp. 155-178. Blackwell Science, Oxford.
- Kasumovic, M. M. & Andrade, M. C. B. (2009). A change in competitive context reverses sexual selection on male size. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 324-333.
- Kirkpatrick, M. (1982). Sexual Selection and the Evolution of Female Choice. *Evolution*, **36**, 1-12.
- Kirkpatrick, M. (1986). The handicap mechanism of sexual selection does not work. *The American Naturalist*, **127**, 222-240.
- Kirkpatrick, M. & Ryan, M. J. (1991). The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature*, **350**, 33-38.

- Kirkpatrick, M. & Hall, D. W. (2004). Sexual selection and sex linkage. *Evolution*, **58**, 683-691.
- Knopek, L. & Hintze-Podufal, C. (1986). Über den Bau der abdominalen Tympanalorgane der Kleinen Wachsmotte *Achroia grisella* (Fbr.). *Zool. Jb. Anat.*, **114**, 83-93.
- Kokko, H. (1998). Good genes, old age and life-history trade-offs. *Evolutionary Ecology*, **12**, 739-750.
- Kokko, H., Brooks, R., McNamara, J. M. & Houston, A. I. (2002). The sexual selection continuum. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **269**, 1331-1340.
- Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M. D. & Morley, J. (2003). The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270**, 653-664.
- Kokko, H., Jennions, M. D. & Brooks, R. (2006). Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**, 43-66.
- Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, **12**, 172-175.
- Kotiaho, J. S. & Puurtinen, M. (2007). Mate choice for indirect genetic benefits: scrutiny of the current paradigm. *Functional Ecology*, **21**, 638-644.
- Kotiaho, J. S., Simmons, L. W. & Tomkins, J. L. (2001). Towards a resolution of the lek paradox. *Nature*, **410**, 684-686.
- Kunike, G. (1930). Zur biologie der kleinen Wachsmotte, *Achroea grisella* (Fabricius). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **16**, 304-356.
- Lafaille, M., Bimbard, G. & Greenfield, M. D. (2010). Risk trading in mating behavior: forgoing anti-predator responses reduces the likelihood of missing terminal mating opportunities. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **64**, 1485-1494.
- Lande, R. (1981). Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**, 3721-3725.

- Lehtonen, T. K. & Lindstrom, K. (2009). Females decide whether size matters: plastic mate preferences tuned to the intensity of male-male competition. *Behavioral Ecology*, **20**, 195-199.
- Lim, H. & M. D. Greenfield (2007). Female pheromonal chorusing in an arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. *Behavioral Ecology*, **18**, 165-173.
- Limousin, D. & Greenfield, M. D. (2009). Evaluation of amplitude in male song: female waxmoths respond to fortissimo notes. *The Journal of Experimental Biology*, **212**, 4091-4100.
- Lynch, M. & Walsh, J. B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 980 p.
- Mappes, J., Alatalo, R. V., Kotiaho, J. & Parri, S. (1996). Viability costs of condition-dependent sexual male display in a drumming wolf spider. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **263**, 785-789.
- Maynard Smith, J. (1976). Sexual selection and the handicap principle. *Journal of Theoretical Biology*, **57**, 239-242.
- Maynard Smith, J. (1985). Sexual selection, handicaps and true fitness. *Journal of Theoretical Biology*, **115**, 1-8.
- Mead, L. S. & Arnold, S. J. (2004). Quantitative genetic models of sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 264-271.
- Midamegbe, A., Vitalis, R., Malausa, T., Delava, E, Cros-Arteil, S. & Streiff, R. (2011). Scanning the European corn borer (*Ostrinia* spp.) genome for adaptive divergence between host-affiliated sibling species. *Molecular Ecology*, **20**, 1414-1430.
- Miller, C. W. & Moore, A. J. (2007). A potential resolution to the lek paradox through indirect genetic effects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **274**, 1279-1286.
- Moller, A. P. & Thornhill, R. (1998). Male parental care, differential parental investment by females and sexual selection. *Animal Behaviour*, **55**, 1507-1515.

- Mossman, C. A. & Drickamer, L. C. (1996). Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *Journal of Comparative Psychology*, **110**, 131-138.
- Musolf, K., Hoffmann, F. & Penn, D. J. (2010). Ultrasonic courtship vocalizations in wild house mice, *Mus musculus musculus*. *Animal Behaviour*, **79**, 757-764.
- Nakano, R., Ishikawa, Y., Tatsuki, S., Surlykke, A., Skals, N. & Takanashi, T. (2006). Ultrasonic courtship song in the Asian corn borer moth, *Ostrinia furnacalis*. *Naturwissenschaften*, **93**, 292-296.
- Narraway, C., Hunt, J., Wedell, N. & Hosken, D. J. (2010). Genotype-by-environment interactions for female preference. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 2550-2557.
- Otte, D. (1977). Communication in Orthoptera. In *How Animals Communicate* (ed. by T. A. Sebeok), pp. 334-361. Indiana University Press, Bloomington.
- Panhuis, T. M., Butlin, R., Zuk, M. & Tregenza, T. (2001). Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 364-371.
- Paterson, H. E. H. (1993). *Evolution and the Recognition Concept of Species*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 256 p.
- Pomiankowski, A. (1987). Sexual selection: the handicap principle does work – sometimes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **231**, 123-145.
- Pomiankowski, A. (1988). The evolution of female mate preferences for male genetic quality. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, **5**, 136-184.
- Pomiankowski, A. & Iwasa, Y. (1998). Runaway ornament diversity caused by Fisherian sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 5106-5111.
- Pomiankowski, A., Iwasa, Y. & Nee, S. (1991). The evolution of costly mate preferences .I. Fisher and biased mutation. *Evolution*, **45**, 1422-1430.
- Qvarnström, A., Brommer, J. E. & Gustafsson, L. (2006). Testing the genetics underlying the co-evolution of mate choice and ornament in the wild. *Nature*, **441**, 84-86.

- Radwan, J. (2008). Maintenance of genetic variation in sexual ornaments: a review of the mechanisms. *Genetica*, **134**, 113-127.
- Reinhold, K., Greenfield, M. D., Jang, Y. & Broce, A. (1998). Energetic cost of sexual attractiveness: ultrasonic advertisement in waxmoths. *Animal Behaviour*, **55**, 905–913.
- Rintamäki, P.T., Alatalo, R. V., Höglund, J. & Lundberg, A. (1995). Mate Sampling Behaviour of Black Grouse Females (*Tetrao tetrix*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**, 209-215.
- Ritchie, M. G. (1996). The shape of female mating preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 14628-14631.
- Ritchie, M. G. (2007). Sexual selection and speciation. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, **38**, 79-102.
- Ritchie, M. G., Saarikettu, M. & Hoikkala, A. (2005). Variation, but no covariance, in female preference functions and male song in a natural population of *Drosophila montana*. *Animal Behaviour*, **70**, 849-854.
- Ritschard, M., Riebel, K. & Brumm, H. (2010). Female zebra finches prefer high-amplitude song. *Animal Behaviour*, **79**, 877-883.
- Rodriguez, R. L. & Greenfield, M. D. (2003). Genetic variance and phenotypic plasticity in a component of female mate choice in an ultrasonic moth. *Evolution*, **57**, 1304-1313.
- Rodriguez, R. L. & Greenfield, M. D. (2004). Behavioural context regulates dual function of ultrasonic hearing in lesser waxmoths: bat avoidance and pair formation. *Physiological Entomology*, **29**, 159-168.
- Rodriguez, R. L., Schul, J., Cocroft, R. B. & Greenfield, M. D. (2005). The contribution of tympanic transmission to fine temporal signal evaluation in an ultrasonic moth. *The Journal of Experimental Biology*, **208**, 4159-4165.
- Roeder, K. D. (1967). Turning tendency of moths exposed to ultrasound while in stationary flight. *Journal of Insect Physiology*, **13**, 873-888.

- Ronacher, B., Krahe, R. & Hennig, R. M. (2000). Effects of signal duration on the recognition of masked communication signals by the grasshopper *Chortippus biguttulus*. *Journal of Comparative Physiology A*, **186**, 1065-1072.
- Rösel von Rosenhof, A. J. [1749] 1978. *Insectenbelustigung* 2. Theil. Reprint. Dortmund: Harenburg Kommunikation, 187 p.
- Rowe, L. & Houle, D. (1996). The Lek Paradox and the Capture of Genetic Variance by Condition Dependent Traits. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **263**, 1415-1421.
- Ryan, M. J. (1991). Sexual selection and communication in frogs. *Trends in Ecology and Evolution*, **6**, 351-355.
- Ryan, M. J. & Keddy-Hector, A. (1992). Directional patterns of female mate choice and the role of sensory biases. *The American Naturalist*, **139**, S4-S35.
- Ryan, M. J. & Rand, A. S. (1993). Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution*, **47**, 647-657.
- Schiolten, P., Larsen, O. N. & Michelsen, A. (1981). Mechanical time resolution in some insect ears. I. Impulse response and time constants. *Journal of Comparative Physiology A*, **143**, 289-295.
- Searcy, W. A. & Nowicki, S. (2005). *The Evolution of Animal Communication: Reliability and Deception in Signaling Systems*. Princeton University Press, Princeton, 288 p.
- Shaw, K. L. & Parsons, Y. M. (2002). Divergence of mate recognition behavior and its consequences for genetic architectures of speciation. *The American Naturalist*, **159**, S61-S75.
- Shaw, K. L. & Lesnick, S. C. (2009). Genomic linkage of male song and female acoustic preference QTL underlying a rapid species radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 9737-9742.
- Shaw, K. L., Parsons, Y. M. & Lesnick, S. C. (2007). QTL analysis of a rapidly evolving speciation phenotype in the Hawaiian cricket *Laupala*. *Molecular Ecology*, **16**, 2879-2892.

- Smith, B. R. & Blumstein, D. T. (2008). Fitness consequences of personality: a meta analysis. *Behavioral Ecology*, **19**, 448-455.
- Snedden, W. A., Tosh, C. R. & Ritchie, M. G. (1994). The ultrasonic mating signal of the male lesser wax moth. *Physiological Entomology*, **19**, 367-372.
- Spangler, H. G., Greenfield, M. D. & Takessian, A. (1984). Ultrasonic mate calling in the lesser waxmoth. *Physiological Entomology*, **9**, 87-95.
- Takanashi, T., Nakano, R., Surlykke, A., Tatsuta, H., Tabata, J., Ishikawa, Y. & Skals, N. (2010). Variation in courtship ultrasounds of three *ostinia* moths with different sex pheromones. *Plos One*, **5**, e13144.
- Tauber, E. & Eberl, D. F. (2003). Acoustic communication in *Drosophila*. *Behavioural Processes*, **64**, 197-210.
- Taylor, P. D. & Williams, G. C. (1982). The lek paradox is not resolved. *Theoretical Population Biology*, **22**, 392-409.
- Thornhill, R. & Alcock, J. (1983). *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 547 p.
- Tomkins, J. L., Radwan, J., Kotiaho, J. S. & Tregenza, T. (2004). Genic capture and resolving the lek paradox. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 323-328.
- Tomlinson, I. P. M. (1988). Diploid models of the handicap principle. *Heredity*, **60**, 283-293.
- Tougaard, J. (1996). Energy detection and temporal integration in the noctuid A1 auditory receptor. *Journal of Comparative Physiology A*, **178**, 669-677.
- Tougaard, J. (1998). Detection of short pure-tone stimuli in the noctuid ear: what are temporal integration and integration time all about? *Journal of Comparative Physiology A*, **183**, 563-572.
- Tougaard, J. (1999). Receiver operating characteristics and temporal integration in an insect auditory receptor cell. *Journal of the Acoustical Society of America*, **106**, 3711-3718.

- Trematerra, P. (1997). Some aspects of the sexual behaviour of the Lepidoptera Pyralidae infesting stored-products. *Anzeiger für Schädlingskunde*, **70**, 87-91.
- Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In *Sexual selection and the descent of man 1871-1971* (ed. by B. G. Campbell), pp. 136-179. Adine, Chicago.
- Van Ooijen, J. W. (1992). Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**, 803-811.
- Van Ooijen, J.W. (2004). MapQTL[®] 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Van Ooijen, J. W. (2006). JoinMap[®] 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Vehrencamp, S. L., Bradbury, J. W. & Gibson, R. M. (1989). The energetic cost of display in male sage grouse. *Animal Behaviour*, **38**, 885-896.
- Wagner, W. E., Jr. (1998). Measuring female mating preferences. *Animal Behaviour*, **55**, 1029-1042.
- Wagner, W. E., Jr., Murray, A. -M. & Cade, W. H. (1995). Phenotypic variation in the mating preferences of female field crickets, *Gryllus integer*. *Animal Behaviour*, **49**, 1269-1281.
- Walker, P. W. & Allen, G. R. (2010). Mating frequency and reproductive success in an income breeding moth: *Mnesampela privata* (Lepidoptera: Geometridae). *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **136**, 290-300.
- Welch, A. M. (2003). Genetic benefits of a female mating preference in gray tree frogs are context-dependent. *Evolution*, **57**, 883-893.
- Wells, K. D. (1977a). Territoriality and male mating success in the green frog (*Rana clamitans*). *Ecology*, **58**, 750-762.
- Wells, K. D. (1977b). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, **25**, 666-693.

- Wright, D., Kerje, S., Brändström, H., Schütz, K., Kindmark, A., Andersson, L., Jensen, P. & Pizzari, T. (2008). The genetic architecture of a female sexual ornament. *Evolution*, **62**, 86-98.
- Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 391 p.
- Wytenbach, R. A. & Farris, H. E. (2004). Psychophysics in insect hearing. *Microscopy Research and Technique*, **63**, 375-387.
- Zahavi, A. (1975). Mate selection – a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, **53**, 205-214.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition. Prentice Hall, New Jersey, 929 p.
- Zhou, Y., Kelly, J. K. & Greenfield, M. D. (2011). Testing the fisherian mechanism: examining the genetic correlation between male song and female response in waxmoths. *Evolutionary Ecology*, **25**, 307-329.



Denis LIMOUSIN

Sélection sexuelle chez un papillon acoustique : Etude évolutive du signal mâle et de la préférence femelle

Résumé

Le processus de sélection intersexuelle peut impliquer plusieurs mécanismes différents dans le choix du partenaire. Chez la pyrale *Achroia grisella*, les femelles choisissent les mâles en se basant sur des caractères de leur chant d'avertissement ultrasonique, et de précédentes études ont montré que ce choix peut procurer, à une femelle discriminante, certains bénéfices génétiques indirects. Dans cette thèse, j'ai continué à explorer le mécanisme de bénéfices indirects chez cette espèce en 1) déterminant avec plus de précision un paramètre acoustique, l'amplitude du chant, qui influence le choix des femelles et en 2) examinant la covariance génétique entre les traits du chant mâle et ceux de la préférence femelle. J'ai constaté qu'en plus de préférer des chants mâles émis avec une plus grande amplitude et une plus grande puissance acoustique, les femelles font également une discrimination en faveur des chants comprenant des forts « pics d'amplitude ». Cependant, mes analyses génétiques moléculaires de la relation entre les traits du signal mâle et ceux de la préférence femelle, n'ont révélé aucune covariance significative, comme prédit par la théorie de la sélection sexuelle. Ces derniers résultats fournissent un aperçu important concernant l'existence d'un tempo réduit de la sélection sexuelle, dans les populations naturelles.

Mots-clés: *Achroia grisella*, sélection sexuelle, signal ultrasonique mâle, préférence femelle, puissance acoustique, évolution du signal, corrélation génétique, QTL

Abstract

The process of inter-sexual selection may involve several different mechanisms of mate choice. In the pyralid moth *Achroia grisella*, females choose males based on characters of their ultrasonic advertisement song, and previous work has indicated that such choice may afford a discriminating female certain indirect genetic benefits. In this thesis I continued to probe the indirect benefits mechanism in this species by 1) determining with more precision one acoustic character, song amplitude, that influences female choice and by 2) examining the genetic covariance between the male song trait and the female preference trait. I found that in addition to preferring male songs delivered at greater amplitude and with greater acoustic power, females also discriminate in favor of songs including higher 'amplitude peaks'. However, my molecular genetic analyses of the relationships between the male signal and female preference traits did not reveal any significant covariance, as predicted by sexual selection theory. These latter findings provide important insight on the reduced tempo of sexual selection that may exist in natural populations.

Key words: *Achroia grisella*, sexual selection, ultrasonic male signaling, female preference, acoustic power, signal evolution, genetic correlation, QTL