

Effets de la température sur la sensibilité  
aux insecticides, le développement et la  
communication chimique du ravageur de  
culture *Spodoptera littoralis*

*Effects of temperature on insecticides sensitivity, development and  
chemical communication of the pest Spodoptera littoralis*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°581 agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)  
Spécialité de doctorat : Ecotoxicologie  
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'UMR **iEES Paris** (Sorbonne Université, CNRS, INRAE) sous la  
direction de **Manuel MASSOT**, Chargé de Recherche (HDR) et la co-direction de  
**David SIAUSSAT**, Maître de Conférences (HDR)

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 07 décembre 2022, par**

**Thibaut BAGNI**

**Composition du Jury**

Membres du jury avec voix délibérative

**Thierry HANCE**

Professeur, Université Catholique de Louvain

Président

**Patricia GIBERT**

Directrice de Recherche, CNRS (Université de Lyon 1)

Rapporteur & Examinatrice

**Joan VAN BAAREN**

Professeure, Université de Rennes 1

Rapporteur & Examinatrice

**Magali PROFFIT**

Chargée de Recherche, CNRS (Université de Montpellier)

Examinatrice

**Titre :** Effets de la température sur la sensibilité aux insecticides, le développement et la communication chimique du ravageur de culture *Spodoptera littoralis*

**Mots clés :** Température, Fluctuation journalière, Ecotoxicologie, Electrophysiologie, Insecte

**Résumé :** Les effets observés et prédits du réchauffement climatique placent les études sur la biologie thermique au cœur des travaux sur le vivant. La température est en effet connue pour influencer quasiment tous les paramètres des ectothermes tels que les insectes. Cette thèse sur la biologie thermique du ravageur de culture *Spodoptera littoralis* est basée sur l'étude expérimentale d'aspects clefs touchant aux effets d'insecticides, aux paramètres de valeur sélective et à la sensibilité olfactive. Les apports de ce travail ont été méthodologiques et conceptuels. Une première contribution méthodologique a été de montrer que l'effet négatif de températures élevées sur la valeur sélective est souvent sous-estimé par l'étude de températures constantes. Une seconde contribution a été de montrer l'intérêt de tester des normes de réaction inter-familiales en écotoxicologie.

Une troisième contribution a été d'illustrer l'importance de prendre en compte la masse corporelle pour l'étude des réponses à la température et aux insecticides. La thèse a également eu trois apports conceptuels d'importance. Une influence de la température sur la toxicité d'insecticides a été montrée, mais elle a interagi avec des effets transgénérationnels. L'ampleur de la fluctuation journalière de température a également eu un impact sur la toxicité d'insecticides. Enfin, la température de développement a affecté la sensibilité olfactive de mâles adultes, effet qui a été dépendant de leur masse corporelle. En conclusion, tous les paramètres étudiés de *S. littoralis* ont été sensibles à la température mais de façon plus complexe que généralement attendu dans la littérature.

**Title :** Effects of temperature on insecticides sensitivity, development and chemical communication of the pest *Spodoptera littoralis*

**Keywords :** Temperature, Daily fluctuation, Ecotoxicology, Electrophysiology, Insect

**Abstract :** The observed and predicted effects of global warming make critical the studies on thermal biology of living organisms. Temperature is indeed known to influence almost all parameters of ectotherms such as insects. This thesis on thermal biology of the crop pest *Spodoptera littoralis* is based on the experimental study of key aspects linked to insecticides effects, fitness parameters and olfactory sensitivity. Methodological and conceptual contributions were made by this work. A first contribution was to show that the negative effect of high temperatures on fitness is often underestimated by studies using constant temperatures. A second contribution showed the benefit to test reaction norms among families in ecotoxicology.

A third contribution was to show the importance of considering body mass for studies on responses to temperature and insecticides. The thesis had also three important conceptual contributions. An influence of temperature on insecticides toxicity was showed, but it interacted with transgenerational effects. The magnitude of daily temperature fluctuation influenced also insecticides toxicity. Finally, developmental temperature influenced olfactory sensitivity of adult males, effect that depended on male body mass. To conclude, all the parameters studied in *S. littoralis* were sensitive to temperature but in a more complex way than usually predicted in literature.

# Remerciements

Au moment de faire le bilan sur ces trois dernières années de thèse, je me rends compte à quel point j'ai été chanceux de travailler au sein de cette équipe exceptionnelle. Malgré une période parfois moins évidente du fait de la crise sanitaire, je ne retiendrai que du positif et de la bienveillance de la part de vous tous.

Forcément, je ne peux que commencer par remercier mes deux chefs, Manuel et David sans qui tout ça n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet à vos côtés.

David, depuis notre rencontre lors du Master EPET, je tenais à te remercier pour ta confiance et ta présence dans les moments où j'en ai eu besoin. Tu as su te montrer rassurant quand il le fallait. Et puis, pour les manips, « c'est facile..! » ;)

Manuel, merci pour tout ce que tu m'as apporté, pour ta patience et tous tes bons conseils, toujours partagés dans la bonne humeur (et toujours avec un jeu de mots, plus ou moins bon, au passage).

A vous deux, vous avez réuni toutes les qualités pour un encadrement parfait, je ne vous remercierai jamais assez.

Annick, « Tata », tu es venue compléter ce duo et tu auras été très importante pour moi également, tant tu as été d'un réel soutien toutes ces années ! Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, ton aide, tes conseils... Je savais que je pouvais tout le temps compter sur toi en cas de besoin.

Thomas et Aude, Chouchou et Chouchou, le duo qui a fortement participé à la bonne humeur permanente au sein du bureau et de l'équipe.

Vous êtes tous les deux devenus de vrais amis pour moi. Mon seul regret est qu'on n'aura jamais réussi à se faire un colloque tous les 3 !

Merci à Thomas C, pour ta curiosité et toutes tes idées, pour toute ton aide avec l'EAG (sans jamais aucune pression pour savoir si j'avais analysé mes résultats, jamais...), mais surtout pour tes magnifiques polyphonies...

Et puis tout simplement merci à tous les membres de cette équipe, sans exception.

Philippe et ses café à la myrte, Anabelle la Chti d'Amiens et ses pompes en sortant du bar, Françoise pour m'avoir tenu compagnie tous les midis (même si je n'ai pas eu le privilège de faire de la BM avec toi), Nico pour les discussions foot (Bastia bien meilleur que le PSG d'ailleurs...), Ludvine, ancienne stagiaire qui est venue prendre la relève en tant que doctorante (et très bonne partenaire de bar avec Thomas..!), Rémi pour les gâteaux au matcha, au yuzu et aux ingrédients exotiques, et pour les bla... ah non pas pour les blagues par contre. Jean Alain avec qui on se motivait mutuellement au moment de rédiger nos mémoires.

Merci également à Martine, Arthur, Eric, Johanna, Stéphane, Matthieu pour cette bonne ambiance dans l'équipe et à tous les collègues de Versailles pour les quelques moments bien sympathiques passés ensemble pendant les raclettes d'hiver et les

jours de fin d'année (même si le Covid en a fait malheureusement sauter certaines...).

Merci à tous ceux qui ne sont plus au laboratoire mais que j'ai pu côtoyer au cours de mon passage, et avec qui on a partagé de bons moments : Emma, Laetitia, Lucie, Nicolas D, Line...

Merci aux deux stagiaires que j'ai pu encadrer. D'abord Clémentine, même si c'est tombé en plein Covid et qu'on a de ce fait très peu travaillé directement ensemble. Puis Mélissa, qui a super bien bossé et qui a apporté sa bonne humeur le temps de son passage au laboratoire. Je remercie aussi tous les autres stagiaires qui sont aussi passés par là : Ines, Morgane, Elsa...

Je tenais aussi à remercier les 3 membres de mon comité de thèse : David, Remy et Olivier. Merci pour votre investissement et pour ces moments de discussion très intéressants.

Merci à l'école doctorale ABIES grâce à laquelle j'ai pu obtenir mon contrat doctoral. Merci également à tous les membres du conseil scientifique pour leur accueil, ce fût une expérience très instructive !

Je voulais également remercier Adrien, Patricia, Céline... et toute l'équipe de l'Université Paris Cité que j'ai pu côtoyer pendant mon enseignement. Merci pour votre gentillesse et votre accueil, ce fût une très belle expérience !

Merci à toute l'équipe administrative de iEES, à Carole, Johana et Véronique pour la gestion de toutes nos commandes et de nos besoins.

Je n'oublie pas Nicolas et Fabienne, avec qui j'ai eu mes premières expériences de stage au Muséum, là où la Recherche a commencé à rentrer dans un coin de ma tête. Merci aussi à vous deux pour avoir été là quand il le fallait.

Je remercie bien évidemment mes parents et mon frère, pour tellement de choses qu'il serait difficile de tout lister ici...

Fanny, pour être mon pilier, et pour me supporter (tout le monde lui dit ça, je ne comprends pas pourquoi...). Je vous aime !

Merci aussi à tous mes copains présents ces dernières années, même si pour beaucoup, j'ai été un éleveur de crevettes (pendant mes premiers stages sur les branchiopodes), puis un éleveur de papillons pendant ma thèse.. !

Sans oublier Piuma et Skippy (oui, je remercie mon chat et mon lapin...) qui ont participé à la rédaction de cette thèse en dormant à côté de moi tout du long, mais qui m'auront bien tenu compagnie pendant ces longues journées.

J'ai bien évidemment une pensée pour ma Tatie, à ce jour la seule Docteure de la famille, qui aurait été tellement fière et émue d'être là... Puis une pensée, toujours, pour Fanny.

# Table des matières

<i>Chapitre I : Introduction</i> .....	1
<i>Chapitre II : Le ravageur de culture <i>Spodoptera littoralis</i></i> .....	14
<i>Chapitre III : Méthodologie</i> .....	19
<i>Chapitre IV : Effets de la température sur la sensibilité aux insecticides...</i>	29
A. Effets de la température sur la sensibilité à la deltaméthrine 'Article Massot et al. 2021' .....	30
B. Effets de la température sur la sensibilité au clorpyrifos 'Article Bagni et al. 2022' .....	61
C. Synthèse .....	85
<i>Chapitre V : Etude de régimes thermiques fluctuants</i> .....	87
A. Comparaison de régimes thermiques constants et fluctuants 'Manuscrit Bagni et al.' .....	88
B. Etude d'une température intermédiaire et de l'état hydrique des adultes.....	121
C. Effets de l'amplitude de variation journalière de la température sur la sensibilité aux insecticides 'Manuscrit Bagni et al.' .....	134
D. Synthèse .....	144
<i>Chapitre VI : Effets de la température sur la communication chimique</i> .....	145
A. Etude de la détection olfactive des femelles .....	146
B. Etude de la détection olfactive des mâles 'Manuscrit Bagni et al.' .....	152
C. Synthèse .....	167
<i>Chapitre VII : Discussion générale</i> .....	168
<i>Références bibliographiques</i> .....	181
<i>Annexes</i> .....	191
A. A maternal effect influences sensitivity to chlorpyrifos pesticide in the pest moth <i>Spodoptera littoralis</i> (Bagni et al. 2020) .....	192
B. Effects of low concentrations of deltamethrin are dependent on developmental stages and sexes in the pest moth <i>Spodoptera littoralis</i> (Malbert-Colas et al. 2020) .....	210
C. Autres activités en relation avec la thèse .....	235

# Liste des figures et tableaux

## Figures :

<b>Figure 1</b> : Augmentation prévue de la température moyenne du globe d'ici 2100 comparé à la période 1850-1900 selon différents scénarios .....	2
<b>Figure 2</b> : Réponse attendue d'une espèce au réchauffement climatique selon la situation thermique à sa localisation géographique .....	4
<b>Figure 3</b> : Prédiction des effets de la température sur la deltaméthrine (pyréthrianoïde de type II) et le chlorpyrifos (organophosphoré) .....	8
<b>Figure 4</b> : Étapes de la détection des odorants chez <i>Spodoptera littoralis</i> .....	10
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique du danger de n'étudier que deux températures dans une gamme de températures favorables à une espèce.....	11
<b>Figure 6</b> : Femelle adulte du papillon de nuit <i>S. littoralis</i> .....	14
<b>Figure 7</b> : Aire de répartition géographique de <i>S. littoralis</i> en 2022 (CABI).....	15
<b>Figure 8</b> : Durée des différents stades de développement de <i>S. littoralis</i> pour une température moyenne de 23°C.....	16
<b>Figure 9</b> : Dimorphisme sexuel au stade chrysalide .....	16
<b>Figure 10</b> : Différentes étapes du cycle de développement de <i>S. Littoralis</i> .....	17
<b>Figure 11</b> : Schéma général des expérimentations réalisées dans la thèse en vue d'étudier les effets de la température de développement .....	19
<b>Figure 12</b> : Photos d'une boîte d'accouplement.....	20
<b>Figure 13</b> : Programmation des enceintes climatiques pour la fluctuation de température en séquences de trois heures sur un créneau de 24h.....	21
<b>Figure. 14</b> : Larves de <i>Spodoptera littoralis</i> .....	22
<b>Figure 15</b> : Photos d'une enceinte climatique et de boîtes expérimentales utilisées lors de mes travaux.....	23
<b>Figure 16</b> : Détermination du nombre d'œufs à partir du poids de la ponte .....	25
<b>Figure 17</b> : Poste d'électroantennographie du laboratoire que j'ai utilisé lors de la thèse .....	27

<b>Figure 18</b> : Détails du poste d'électroantennographie .....	28
<b>Figure 19</b> : Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sur la mortalité des œufs et des larves .....	124
<b>Figure 20</b> : Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sur la survie nymphale et la durée de développement.....	125
<b>Figure 21</b> : Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sur la masse corporelle et la teneur en eau des femelles adultes.....	127
<b>Figure 22</b> : Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sur la masse corporelle et la teneur en eau des mâles adultes.....	128
<b>Figure 23</b> . Influence de la température journalière fluctuante sur le taux de multiplication.....	130
<b>Figure 24</b> : Réponses mesurées par électroantennographie (EAG) chez les femelles <i>S. littoralis</i> pour la phéromone sexuelle et cinq odeurs de plantes.....	148
<b>Figure 25</b> : Taux de multiplication en fonction de la température de développement .....	171

**Tableau :**

<b>Tableau 1</b> . Influence de la température de développement sur l'ensemble des paramètres étudiés. Les températures testées étaient 25, 29, 31 et 33°C avec $\pm 5^{\circ}\text{C}$ autour des moyennes journalières .....	123
--	-----



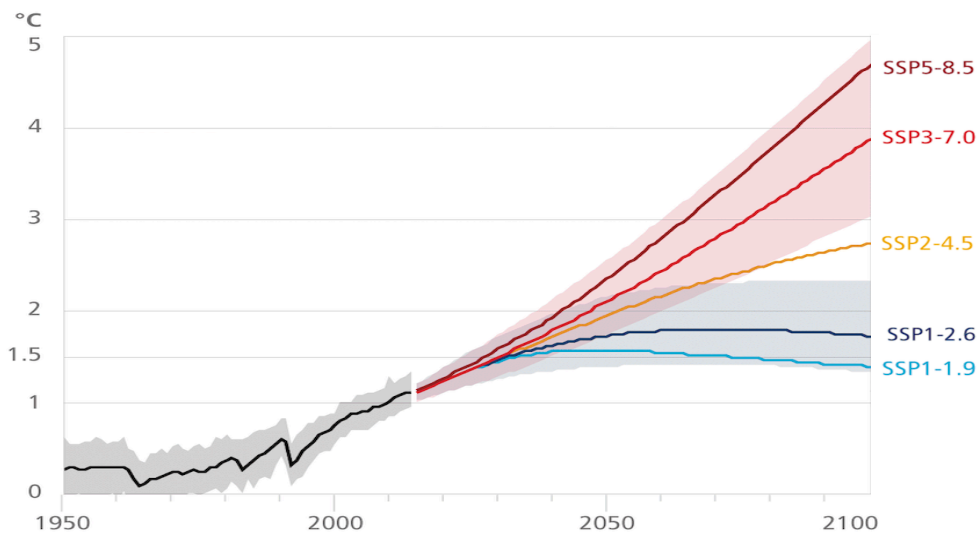


# Chapitre I. Introduction

Les organismes sont exposés à une multitude de facteurs environnementaux, d'origine anthropique ou naturelle, qui peuvent influencer sur de nombreux processus depuis le niveau cellulaire jusqu'au niveau populationnel. Parmi tous ces facteurs, la température est un de ceux qui peut affecter le plus grand nombre de paramètres (Angilletta 2009). A la différence des homéothermes dont la température corporelle est relativement fixe, les ectothermes, dont la température corporelle est dépendante de la température extérieure, subissent plus les effets des variations de température du milieu. Comprendre les effets du changement de température sur les ectothermes est donc crucial. La thèse se place dans ce contexte avec une étude de la biologie thermique d'un important ravageur de cultures, la noctuelle du coton *Spodoptera littoralis*.

## ***1. Augmentation de la température moyenne et des fluctuations journalières***

La température à la surface de la terre augmente depuis maintenant plusieurs décennies. Ce phénomène est provoqué par les émissions de gaz à effet de serre, principalement de CO<sub>2</sub>. Selon le rapport 2022 de l'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), différents scénarios sont envisageables dans les années à venir en fonction de l'évolution de notre façon de produire et de consommer. Depuis les années 1850-1900, la température globale de la surface terrestre a déjà augmenté de 1°C (Figure 1). La température sera encore amenée à augmenter dans tous les scénarios envisagés. La température n'augmenterait 'que' de 1,5°C d'ici 2100 dans le meilleur des cas si des changements de production et consommation plus durables étaient mis en œuvre à l'échelle mondiale. Si rien n'est fait, la température planétaire pourrait augmenter de 2,5°C, voire même de 4,5°C dans le pire des scénarios. Au-delà des 2°C, il est attendu des répercussions majeures sur les espèces et les écosystèmes, avec des changements irréversibles.



**Figure 1 :** Augmentation prévue de la température moyenne du globe d'ici 2100 comparé à la période 1850-1900 selon différents scénarios. L'intervalle de probabilité des scénarios SSP1-2.6 et SSP3-7.0 sont représentées par les surfaces grise et rouge. Cette figure est une version modifiée à partir d'une figure du rapport IPCC 2022.

En plus de l'augmentation moyenne de la température, le réchauffement climatique a également augmenté l'amplitude moyenne des fluctuations journalières de température. Entre 1975 et 2013, la fluctuation journalière de température s'est accrue de 1,4°C dans les régions polaires, de 1,0°C dans les régions tempérées et de 0,3°C dans les régions tropicales (Wang & Dillon 2014). Cet effet qui reste encore peu considéré pourrait avoir des conséquences tout aussi importantes sur les organismes que l'augmentation de la température moyenne, et plus encore avec les deux évolutions conjuguées (Vasseur et al. 2014). La conjonction des deux changements confronte en effet les organismes à des épisodes chauds et souvent répétés sur plusieurs jours. Il est prédit que les épisodes caniculaires liés à ce changement climatique affecteront particulièrement les invertébrés des régions tempérées (Vasseur et al. 2014).

Les changements de température peuvent jouer à l'échelle de quelques minutes pour des animaux qui se déplacent jusqu'à celle d'années avec des météorologies contrastées, et en passant par les variations saisonnières. Rien qu'à l'échelle de la journée, il y a souvent un important contraste entre les températures nocturnes les plus froides et diurnes du milieu de journée. Malgré cet état de fait bien connu, et pour des raisons de facilité expérimentale, l'essentiel des études de biologie thermique (tout comme la

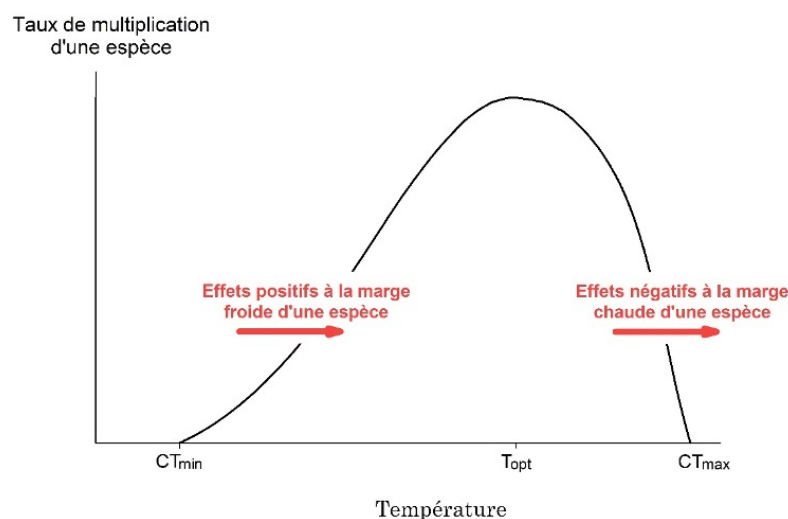
quasi-totalité des autres études de laboratoire) sont réalisées avec des températures constantes. C'est seulement depuis peu que des études ont mis en évidence des biais de ne pas appliquer des températures journalières fluctuantes (Ma et al. 2015; Colinet et al. 2015; Stoks et al. 2017). La nécessité d'étudier les effets des fluctuations thermiques journalières a encore été récemment confortée par le constat que l'amplitude des fluctuations journalières de température a augmenté dans l'ensemble des régions de la Terre (Wang et Dillon 2014), en parallèle avec le réchauffement climatique.

Bien que l'augmentation des températures et de leur fluctuation journalière soient moindres dans les régions tropicales, l'impact de ces changements pourrait aussi être considérable sur les espèces tropicales. En effet, elles vivent déjà avec des températures proches de leur limite thermique maximale (CT<sub>max</sub>) (Figure 2) et une faible augmentation de température suffit à nuire à ces espèces (Deutsch et al. 2008). Des effets de ce type ont déjà été montrés et à titre d'exemple il a d'ores et déjà été observé que le nombre d'espèces de noctuelles dans le Nord-Est de l'Italie (mélange d'espèces méditerranéennes et d'Europe centrale) a été négativement lié à la température pendant les 20 dernières années (Uhl et al. 2022). Dans cet exemple, la relation a sans doute été principalement due à l'impact de la température sur les noctuelles d'Europe centrale qui sont à la marge chaude de leur aire de répartition.

Pour certaines espèces, le réchauffement climatique peut entraîner la colonisation de zones où les conditions étaient précédemment trop froides (en marge froide des espèces), ou à l'inverse entraîner des extinctions dans des zones où les températures sont devenues trop élevées (en marge chaude des espèces) (Parmesan et al. 1999; Gaillard et al. 2012). Dans les deux cas, ceci modifie la composition des communautés d'espèces et peut altérer le fonctionnement des écosystèmes. Si l'on considère l'établissement d'espèces dans de nouvelles zones, certaines de ces espèces pourront avoir un potentiel invasif (Ward et Masters 2007). Par exemple, on a connu une remontée progressive de la chenille processionnaire du pin *Thaumetopoea pityocampa* en France ces dernières années, principalement à cause d'hivers plus chauds que par le passé (Battisti et al. 2005).

## 2. Effets de la température sur le taux de multiplication des espèces

Les Courbes de Performance Thermique (TCP) décrivent les réponses de paramètres à des variations de température. Chez les ectothermes, la forme de ces courbes est souvent assez similaire entre les différents paramètres. La figure 2 donne un exemple théorique de TCP pour le taux de multiplication d'une espèce. Ce type de courbe s'observe aussi tout à fait pour la plupart des paramètres liés à la valeur sélective des individus (Colinet et al. 2015; Martin & Huey 2008; Paaijmans et al. 2013; Stoks et al. 2017). Les TCP sont caractérisées par trois valeurs : la température optimale ( $T_{opt}$ ) et les températures critiques maximales ( $CT_{max}$ ) et minimales ( $CT_{min}$ ). Si l'on considère le cas d'une espèce, sa gamme de tolérance thermique se situe ainsi entre ses  $CT_{min}$  et  $CT_{max}$ , au-delà desquelles son taux de multiplication est nul à cause de conditions thermiques trop défavorables pour sa survie, son développement et/ou sa reproduction. Pour des températures supérieures à  $CT_{min}$  et croissantes, le taux de multiplication augmente jusqu'à sa valeur maximale à  $T_{opt}$ , là où la température est la plus optimale à la multiplication de l'espèce. Au-delà de cette température, le taux de multiplication de l'espèce décroît fortement jusqu'au point critique  $CT_{max}$  (Figure 2).



**Figure 2 :** Réponse attendue d'une espèce au réchauffement climatique selon la situation thermique à sa localisation géographique. La réponse est ici schématisée en regard d'une courbe théorique de performance thermique (TPC) exprimant le taux de multiplication d'une espèce en fonction de la température. Les températures  $T_{opt}$ ,  $CT_{min}$  et  $CT_{max}$  représentent respectivement la température optimale de l'espèce, sa température minimale supportée et sa température maximale supportée.

Les variations de température qui sont susceptibles d'affecter de nombreux processus chez les insectes ectothermes (Angilletta 2009) déterminent au final le taux de multiplication des espèces. En ce qui concerne les insectes ravageurs dans le cœur de leur aire de répartition, c'est-à-dire sans contrainte thermique majeure, l'élévation de la température devrait augmenter leur métabolisme, et en conséquence leur consommation de nourriture, ainsi que le taux de croissance de leurs populations et leur abondance, avec au bout du compte un accroissement important de leurs dégâts dans les cultures (Deutsch et al. 2018). Pour les ravageurs avec du voltinisme (avec plusieurs générations possibles par an), l'augmentation de la température pourrait également leur permettre d'avoir un plus grand nombre de générations annuelles et d'allonger leur période d'activité (Altermatt 2010), contribuant ainsi d'autant plus à accroître leurs dégâts.

### ***3. Augmentation de l'utilisation des insecticides***

Avec l'augmentation attendue des dégâts des insectes ravageurs dans les cultures (Deutsch et al. 2018), il est à craindre que cela conduise à une utilisation plus fréquente d'insecticides. L'utilisation des insecticides est une pratique très ancienne, où le soufre et l'arsenic étaient par exemple utilisés dès l'antiquité. Si d'autres produits ont ensuite été utilisés au cours de l'histoire, c'est à partir des années 1940 que les insecticides de synthèse se sont réellement développés. Bien que ces substances soient utilisées dans de nombreux domaines dans la lutte contre les insectes (hygiène, entretien, santé publique, ...), l'utilisation principale de ces produits est dans le domaine agricole afin de lutter contre des insectes ravageurs. Les insecticides sont actuellement utilisés partout à travers le monde et sur une multitude de plantes (Tang et al. 2021). Les cibles de l'action de ces insecticides sont variées mais les plus fréquentes sont liées au système nerveux des insectes. Ces substances neurotoxiques provoquent en général des paralysies pouvant entraîner la mort. Bien qu'il existe de nombreuses classes d'insecticides avec des structures et des effets différents, je présenterai seulement les deux insecticides étudiés dans la thèse, le chlorpyrifos et la deltaméthrine.

Le chlorpyrifos fait partie de la famille des organophosphorés. Les organophosphorés, dont les premiers produits ont été développés dans les années 1940, représentent plus de 50% des insecticides utilisés à travers le monde. Bien qu'ils aient été bannis récemment dans certains pays (dont la France), le chlorpyrifos est un des organophosphorés les plus utilisés dans le monde, que ce soit en agriculture ou pour des usages domestiques (Rahman et al. 2021). Cet insecticide est un neurotoxique qui bloque les sites actifs de l'acétylcholinestérase. Cette enzyme a pour but d'hydrolyser l'acétylcholine, un neurotransmetteur permettant la contraction de muscles. En présence de chlorpyrifos, cette enzyme n'est pas hydrolysée et stimule en permanence la contraction des muscles, provoquant ainsi une paralysie ou la mort des insectes.

La deltaméthrine quant à elle fait partie de la famille des pyréthrinoïdes. Ces molécules de synthèse sont apparues dans les années 1970-80 et sont des analogues aux pyréthrines, des métabolites secondaires des fleurs de chrysanthème. Cette famille se compose de deux types, les pyréthrinoïdes des types I et II, selon la présence ou non d'une liaison  $\alpha$ -cyanée. La deltaméthrine est un pyréthrinoïde de type II. Ces insecticides prolongent l'ouverture des canaux sodiques des neurones en agissant sur la sous-unité  $\alpha$  de ces canaux, provoquant un flux continu d'ions sodium. Alors que les pyréthrinoïdes de type I provoquent une activité électrique répétitive qui provoque surtout des paralysies, ceux de type II sont considérés comme plus toxiques et létaux en prolongeant l'ouverture des canaux sodiques et empêchant ainsi la transmission des influx nerveux. Ces insecticides sont largement utilisés car ils présentent une forte toxicité pour les insectes, mais avec une toxicité réduite pour les mammifères (Bradbury et Coats 1989; Goulding et al. 2013). Bien que la persistance de la deltaméthrine dans l'environnement ne soit pas très importante, ses faibles doses peuvent quand même entraîner des effets hormétiques (Lalouette et al. 2016).

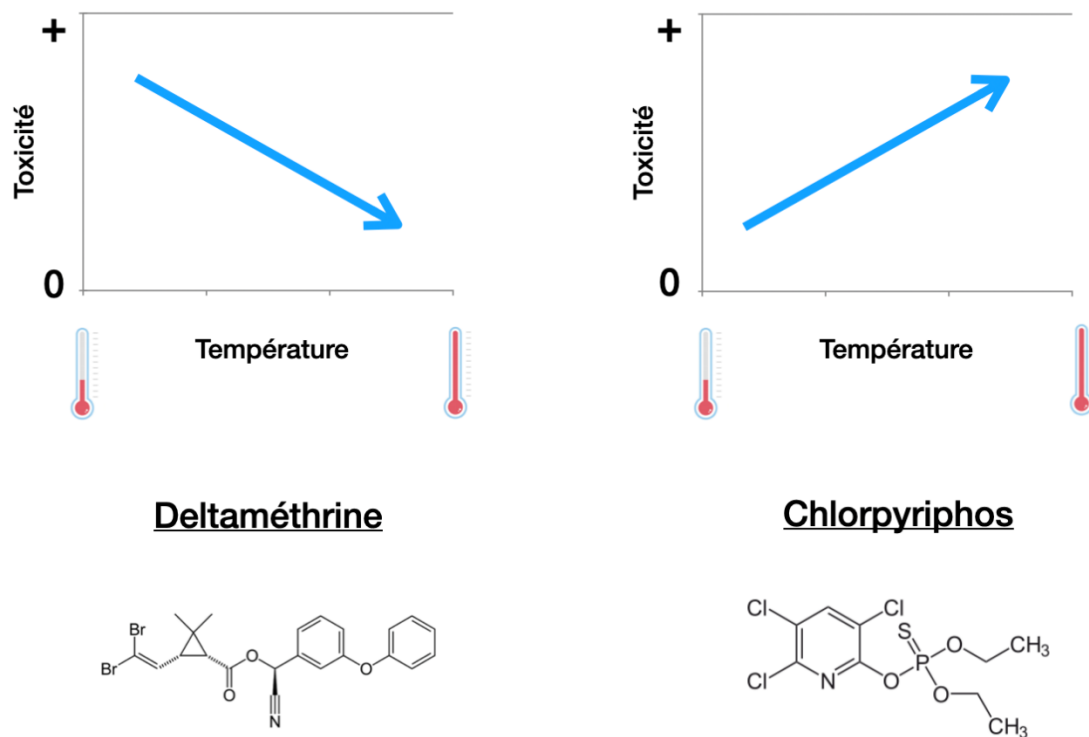
Parmi les problèmes posés par l'utilisation des insecticides, leur impact sur les espèces non ciblées n'est pas à négliger (Müller 2018). La question des effets de faibles doses d'insecticides qui contaminent les milieux se pose aussi depuis quelques années (Casida 2009; Amaroli 2014; Lima et al. 2015). Pour les ravageurs, ces faibles doses

peuvent aussi favoriser l'évolution de résistances ou bien stimuler des résurgences en raison d'effets hormétiques (effets bénéfiques de faibles doses de substances toxiques) (Cutler 2013; Lalouette et al. 2016; Malbert-Colas et al. 2020). De plus en plus d'études s'intéressent à ces effets de doses non léthales d'insecticides, et ce d'autant plus que ces effets pourraient interagir avec l'élévation des températures liée au changement climatique (Hooper et al. 2013).

#### ***4. Interaction entre la température et les insecticides***

Dans leur environnement, les organismes sont confrontés à des contraintes diverses (température, hygrométrie, nourriture, pathogènes, insecticides, etc.). Ces différents facteurs peuvent éventuellement agir de façon combinée. Si leurs effets peuvent être seulement additifs, leurs impacts peuvent aussi être synergiques avec un effet combiné amplifié, ou à l'inverse leurs impacts peuvent être antagonistes avec un effet combiné réduit (Delnat et al. 2019). Depuis plusieurs années, des études montrent que la température peut ainsi interagir avec les insecticides et modifier leurs effets (Noyes et al. 2009; Hooper et al. 2013; Lima et al. 2015; Dinh et al. 2016; Fournier-Level et al. 2016). Les différents mécanismes pouvant expliquer ces modifications seraient des influences de la température sur les taux d'ingestion et d'excrétion des organismes (Hooper et al. 2013; Noyes et al. 2009), l'activité des enzymes de détoxification (aspect non étudié mais ces enzymes devraient réagir comme les autres comme décrit par Angilletta 2009 et Kingsolver 2009) et la biotransformation des molécules d'insecticides en dérivés avec une toxicité différente (Hooper et al. 2013; Noyes et al. 2009). La façon dont la température interagit avec les insecticides dépend de leur classe chimique. Des températures plus élevées augmentent généralement la toxicité des organophosphorés et diminuent celle des pyréthrinoïdes de type I. Ces deux effets opposés sont observés avec les pyréthrinoïdes de type II. En tant qu'organophosphoré, le chlorpyrifos est donc attendu plus toxique à des températures plus élevées (Lydy et al. 1999; Meng et al. 2020; Tran et al. 2018), principalement suite à l'augmentation de sa dégradation dans sa forme

dérivée 'chlorpyriphos-oxon' qui est plus toxique (Rahman et al. 2021). La deltaméthrine, qui fait partie des pyréthriinoïdes de type II, a été montrée avoir une toxicité diminuée avec une température élevée chez *S. littoralis* (Riskallah 1984). Les prédictions pour les deux insecticides étudiés sont schématisées dans la figure 3.



**Figure 3** : Prédiction des effets de la température sur la deltaméthrine (pyréthriinoïde de type II) et le chlorpyriphos (organophosphoré).

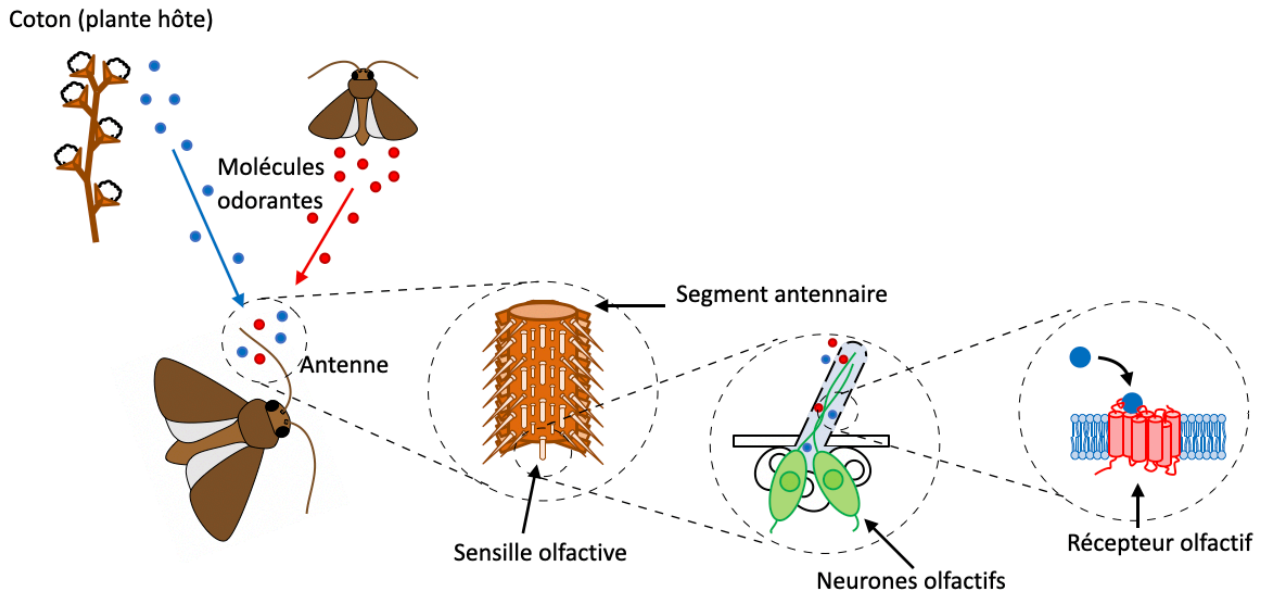
Pour des doses pas trop élevées, l'efficacité des insecticides peut varier selon les individus. Cette variabilité peut avoir une origine génétique, notamment si des gènes de résistance sont impliqués, mais elle peut aussi être causée par de la plasticité phénotypique induite par des différences d'histoire environnementale entre les individus. En particulier, de plus en plus d'effets environnementaux différés entre générations, des effets transgénérationnels (Latzel 2015), sont pensés expliquer une part importante de la plasticité phénotypique (Moore et al. 2019). Une étude récente (Tran et al. 2018) a ainsi montré qu'une exposition au chlorpyriphos et à une température élevée a modifié la sensibilité de la descendance au chlorpyriphos chez le moustique *Culex pipiens*.



### ***5. Effet de la température sur la communication chimique***

Un des impacts attendus du réchauffement climatique sur les insectes concerne leur communication chimique (Boullis et al. 2016; Roggatz et al. 2022). Tous les organismes communiquent entre eux et perçoivent d'autres espèces par des moyens sonores, visuels, olfactifs, tactiles, électriques ou encore chimiques. La communication peut donc être intra- ou interspécifique et correspond à l'émission d'une information par un organisme dit émetteur, information qui est perçue par un organisme receveur. Chez l'essentiel des insectes, la communication chimique par voie olfactive est prédominante. Leur communication intraspécifique est aussi souvent basée sur des phéromones. De par leur activité nocturne, la grande majorité des noctuelles utilisent les phéromones pour la communication sexuelle. Les femelles produisent et émettent ces molécules qui se dispersent pour être perçues par des mâles qui se dirigent alors vers la femelle détectée. En ce qui concerne la communication interspécifique, les insectes perçoivent également des molécules odorantes issues de plantes (Groot & Zizzari 2019). Ceci permet aux papillons de s'alimenter et de trouver des sites de ponte sur des plantes hôtes favorables au développement des larves.

Les insectes détectent principalement les odorants grâce à leurs antennes. Ces dernières sont composées de sensilles, des extensions cuticulaires dans lesquelles se trouvent des neurones olfactifs. Les molécules odorantes détectables par le papillon se fixent sur les récepteurs de ces neurones (récepteurs olfactifs) et l'information est transmise au système nerveux central par les nerfs antennaires. Les différentes étapes de la détection olfactive de mon espèce d'étude *S. littoralis* sont présentées dans la figure 4.



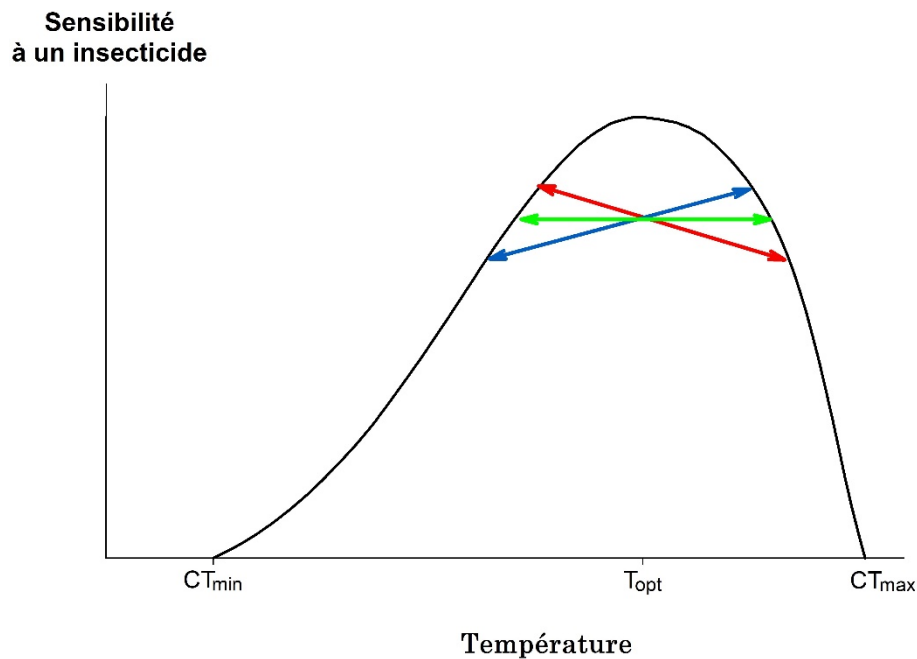
**Figure 4 :** Étapes de la détection des odorants chez *Spodoptera littoralis*. Figure de Montagné et al. 2015 modifiée à partir d'illustrations réalisées par Arthur de Fouchier.

## 6. Structure de la thèse et questions posées

Les différents éléments qui viennent d'être présentés forment le cadre aux principaux objectifs des travaux de la thèse sur le ravageur de cultures *S. littoralis*. Trois chapitres présenteront les études des trois grands axes de la thèse.

Un premier chapitre portera sur l'influence de la température de développement sur la sensibilité aux insecticides. Ce chapitre est composé de deux parties qui couvriront successivement une expérimentation sur la deltaméthrine et une expérimentation sur le chlorpyrifos. Dans ce chapitre, je me suis particulièrement intéressé à l'influence possible des effets transgénérationnels (étude de variabilités inter-familiales) sur les effets combinés des insecticides et de la température. En effet, la sensibilité des larves de *S. littoralis* à l'insecticide chlorpyrifos est influencée par la masse corporelle de leur mère (étude présentée dans l'article de l'annexe A de la thèse (Bagni et al. 2020)). Un autre point a été considéré dans mes travaux sur l'interaction entre insecticides et température. De manière assez atypique dans les études des effets de la température sur la sensibilité aux insecticides, j'ai fait des tests sur plusieurs températures proches les unes des autres (23, 25, 27 et 29°C) dans une gamme thermique favorable à *S.*

*littoralis*. C'était un choix méthodologique justifié par la non linéarité des réponses à la température. En effet, cette non linéarité peut conduire à trouver tous les résultats possibles à partir de l'étude de seulement deux températures, et ainsi masquer la véritable relation globale (Figure 5).



**Figure 5 :** Représentation schématique du danger de n'étudier que deux températures dans une gamme de températures favorables à une espèce. Des différences de réponse aux deux températures sont ici représentées en regard d'une courbe théorique de performance thermique (TPC) exprimant la sensibilité d'une espèce à un insecticide en fonction de la température. Du fait de la non linéarité de la TPC, l'étude de seulement deux températures peut aboutir à trouver une relation positive (en bleu), non significative (en vert) ou négative (en rouge) pour de petites différences dans les températures expérimentales choisies.

Le chapitre suivant traitera de l'étude de l'influence des températures journalières fluctuantes. Cette étude a été réalisée au travers de trois expérimentations. La première a comparé les effets de températures fluctuantes et constantes appliquées sur l'entièreté du cycle de développement de *S. littoralis*. Étant donné la réponse non linéaire des organismes à la température, la fluctuation journalière des températures peut avoir des effets différents selon son amplitude et la zone thermique qu'elle englobe. Par exemple, l'effet d'une fluctuation dans des températures proches de l'optimum ne devrait pas être le même que celui dans une zone de températures très élevées

et proches de la limite supportée par l'organisme. Cette étude a été complétée par une revue de la littérature chez les insectes. La seconde expérimentation a précisé les effets observés pour une température complémentaire entre l'optimum et la limite supérieure supportée par l'espèce. Cette expérimentation a aussi permis de collecter des informations sur l'état hydrique des individus après tout un cycle de développement à différentes températures fluctuantes. La troisième expérimentation a testé l'impact des températures fluctuantes, et de leur amplitude, sur la sensibilité aux insecticides. En plus d'effets directs, l'influence de la fluctuation des températures peut en effet se manifester sur l'effet d'autres facteurs comme les insecticides. Une étude récente de Verheyen et Stoks (2019) a souligné l'intérêt de cette problématique en montrant qu'une dose de chlorpyrifos n'entraînant pas de mortalité à température constante devenait létale avec des températures fluctuantes. Dans mon expérimentation, j'ai examiné une telle relation avec les deux insecticides considérés dans la partie sur l'interaction entre insecticide et température, la deltaméthrine et le chlorpyrifos.

Le troisième chapitre présentera mes travaux relatifs aux effets de la température sur la communication chimique de *S. littoralis*, avec une partie sur les femelles et une partie sur les mâles. Dans cette partie de la thèse où j'ai testé l'effet direct de la température de développement sur la détection olfactive d'adultes, j'ai aussi examiné un effet indirect. Cet effet indirect reposerait sur une influence de la température très documentée chez les ectothermes, à savoir une diminution de la taille des individus avec une augmentation de la température de développement (Atkinson 1994). Dans la mesure où la taille des individus est également souvent corrélée positivement à la qualité de l'organisme (Kingsolver et Huey 2008), la réduction de la taille des individus pourrait réduire leurs performances tel que leur capacité à détecter des odorants. Cette hypothèse n'est pas à négliger quand on sait qu'un des effets principaux du réchauffement climatique sur les espèces a souvent été une diminution de la taille des individus (Daufresne et al. 2009; Weeks et al. 2020).

Après une présentation du modèle biologique *S. littoralis* et des principales méthodologies utilisées au cours de la thèse, ce document exposera mes travaux dans les trois chapitres qui viennent d'être présentés. Une introduction débutera chacun de ces trois chapitres et les différentes sous-parties des chapitres (correspondant chacune à une expérimentation), et seront suivies d'une courte synthèse.

Plusieurs annexes sont aussi présentées en fin de document :

- L'annexe A est un article que nous avons publié en 2020 dans **Ecotoxicology and Environmental Safety** et qui traite de l'influence d'effets maternels sur la sensibilité au chlorpyrifos de larves de *Spodoptera littoralis*. Cet article sera évoqué lors de discussions sur les effets transgénérationnels considérés dans l'étude de l'influence de la température sur la sensibilité aux insecticides.
- L'annexe B est un article auquel j'ai contribué et qui a été publié en 2020 dans **Environmental Science and Pollution Research**. Il traite des effets de faibles doses de deltaméthrine sur *Spodoptera littoralis*. Outre que cette annexe justifie les doses que j'ai utilisé lors de mes expérimentations avec la deltaméthrine, elle illustre et discute différents effets liés aux doses non létales d'insecticides et montre la variabilité de ces effets selon l'âge et le sexe chez mon espèce d'étude.

Globalement, cette thèse sur articles a été réalisée sur la base de quatre articles publiés (sous-chapitres IV<sub>A</sub> et IV<sub>B</sub>, annexes A et B) et trois articles sur le point d'être soumis (sous-chapitres V<sub>A</sub>, V<sub>C</sub> et VI<sub>B</sub>). Si la partie V<sub>B</sub> ne présente pas des données suffisantes pour aboutir à une publication, ses résultats sont importants pour la thèse dans l'optique d'une poursuite de la thématique du chapitre V. Pour finir, il est à noter que la partie VI<sub>A</sub> traitant de l'effet de la température de développement sur la détection olfactive des femelles ne donnera pas lieu à une publication. Il m'a cependant paru important de l'inclure dans la thèse afin de justifier son abandon en raison d'un biais méthodologique inattendu.

## Chapitre II. Le ravageur de culture *Spodoptera littoralis*

La noctuelle du coton *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae, Boisduval 1833) (Figure 6) est un ravageur de culture polyphage qui s'attaque à 40 familles de plantes et au moins 87 espèces d'intérêt économique (Salama et al. 1971).



Figure 6 : Femelle adulte du papillon de nuit *S. littoralis*.

### Répartition géographique

La noctuelle du coton est originaire du nord de l'Afrique et s'est répandue sur tout le continent Africain, ainsi que vers l'Asie et le sud de l'Europe (Figure 7). Elle est actuellement classée A2 sur la liste de 2021 des espèces de quarantaine de l'OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes), et ce depuis 1981. Ceci veut dire qu'elle est considérée comme nuisible et qu'il est demandé aux pays membres de la traiter comme une espèce de quarantaine. Les premiers dégâts observés en France datent de 2007 dans les Alpes Maritimes, puis d'autres ont ensuite été signalés dans la région de Montpellier en 2008 (Cocquempot & Ramel 2015) et en Corse en 2009 (<https://fredon.fr/corse/techniques/ravageurs/la-noctuelle-mediterranee>).

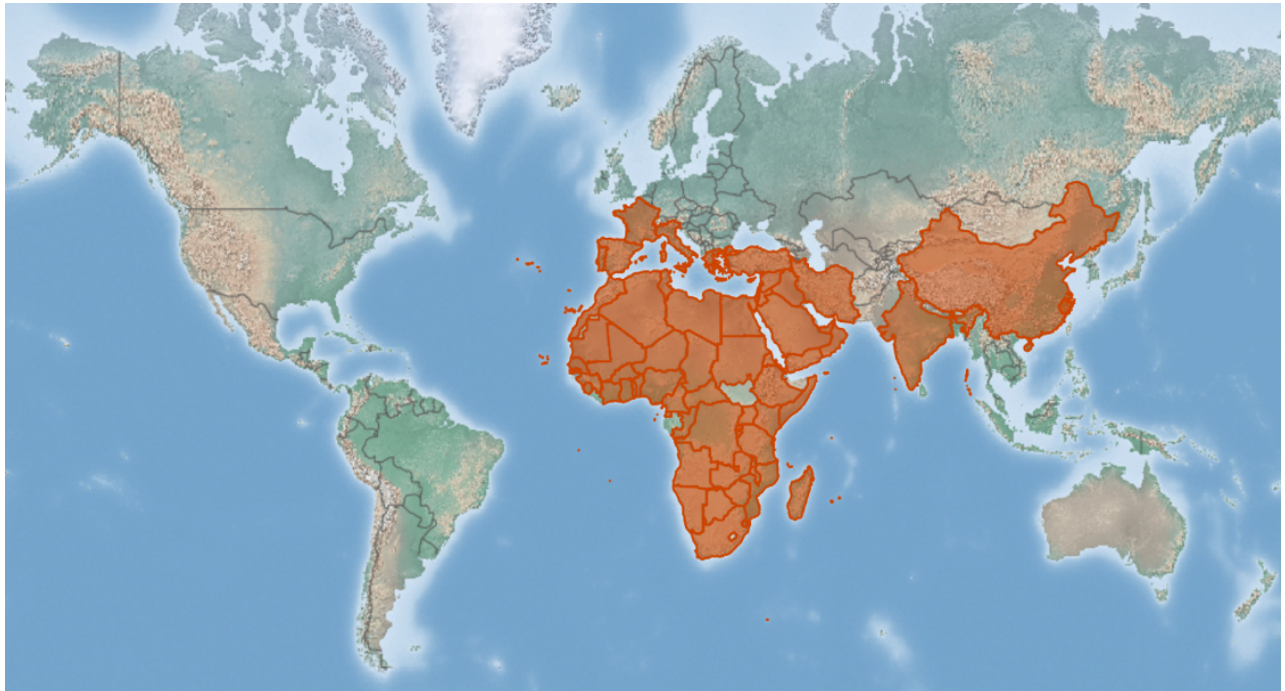
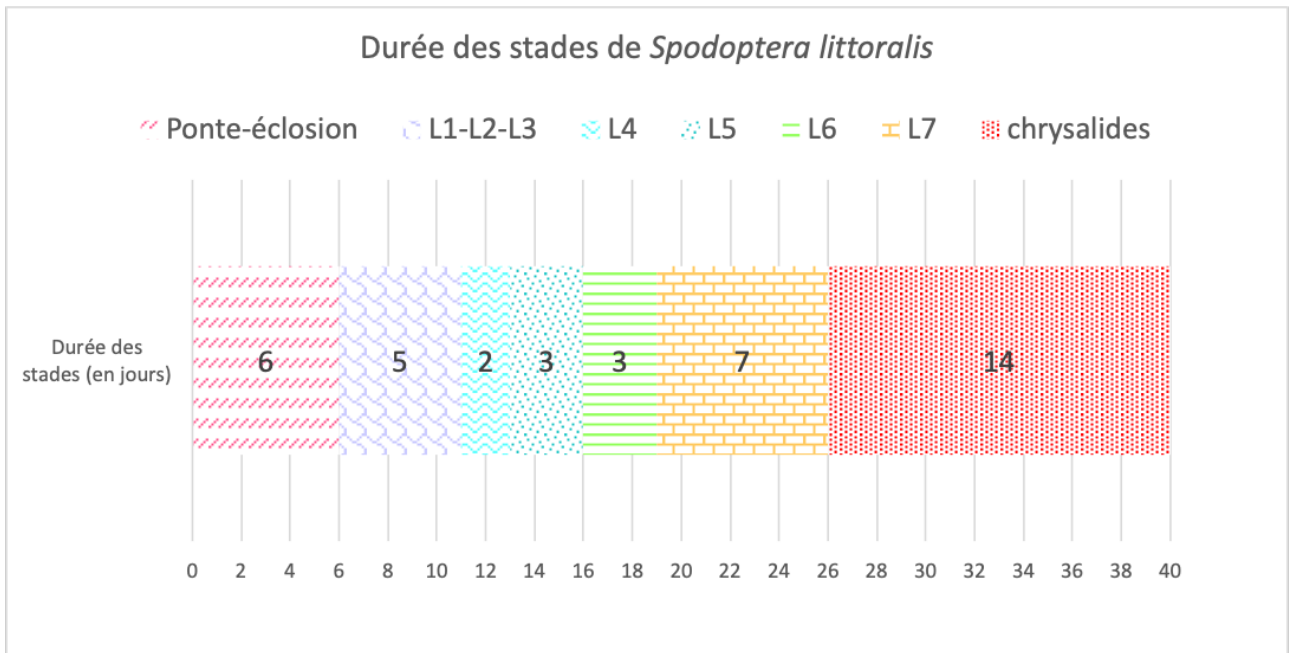


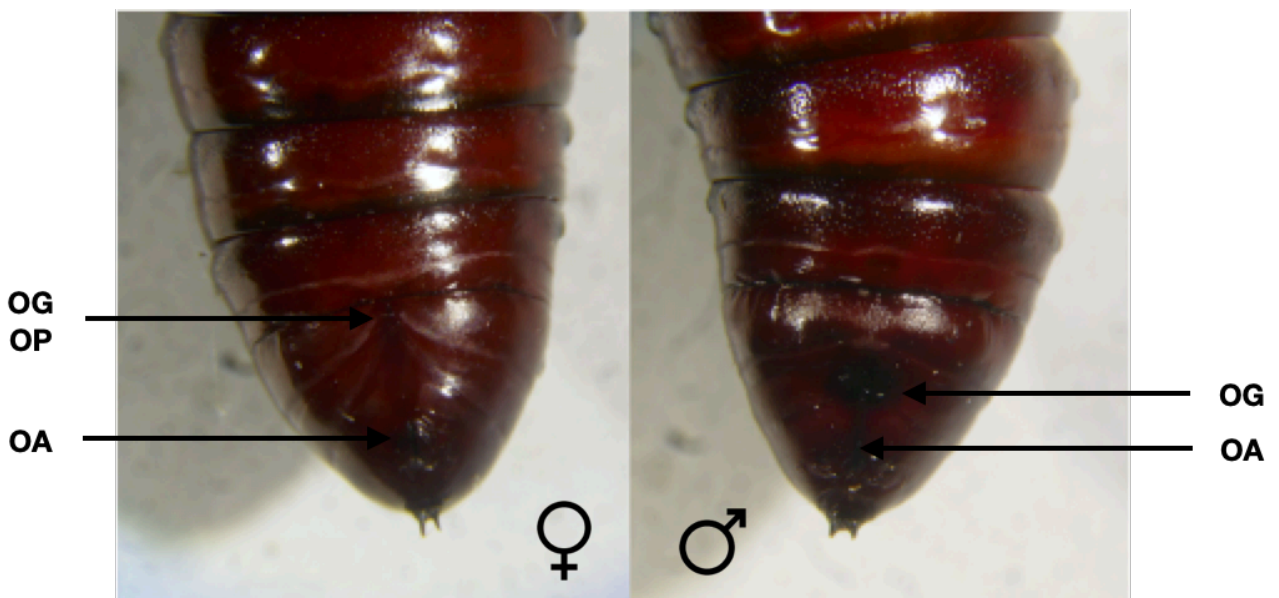
Figure 7 : Aire de répartition géographique de *S. littoralis* en 2022 (CABI).

## Biologie et développement

Le cycle de *S. littoralis* est composé de 6 ou 7 stades larvaires (avec un quatrième stade doublé lorsque les conditions environnementales sont défavorables) et d'un stade nymphal (Figure 8). Au sein d'une cohorte, on peut distinguer le stade larvaire visuellement grâce à la taille et la couleur ainsi que par l'observation des capsules céphaliques issues des mues qui séparent les différents stades. A la fin la phase larvaire, la chenille perd une partie de son eau corporelle, arrête de s'alimenter et s'enfouit dans le sol. Elle se nymphose alors pour devenir une chrysalide. C'est à ce stade chrysalide que le sexe des individus est facilement identifiable grâce à un dimorphisme sexuel (Figure 9). Au stade adulte, bien que les mâles soient en moyenne plus petits que les femelles, seule une légère coloration au niveau des ailes permet de les différencier. Le cycle de vie complet de la ponte à l'émergence de l'adulte dure en moyenne 40 jours à une température de 23°C (Figure 8). La femelle peut pondre jusqu'à un millier d'œufs dans sa vie. Les œufs sont pondus sous formes d'ooplaques qui sont recouvertes par des écailles déposées par la femelle (Figure 10). Les œufs mettent en moyenne 4 jours pour éclore à 23°C.



**Figure 8 :** Durée des différents stades de développement de *S. littoralis* pour une température moyenne de 23°C. Figure réalisée par Annabelle Fuentes et Annick Maria. A noter que la durée 'Ponte-éclosion' de 6 jours qui est ici indiquée inclue le temps pour réaliser les accouplements et obtenir les pontes.



**Figure 9 :** Dimorphisme sexuel au stade chrysalide (OA : orifice anal; OG : orifice génital; OP : orifice de ponte)





**Figure 10** : Différentes étapes du cycle de développement de *S. Littoralis*. Les photos montrées ici représentent successivement (de en haut à gauche à en bas à droite) une ponte, une éclosion, de jeunes larves L2 à L3, des larves au stade L6 dans leur milieu d'élevage (vermiculite et cube de nourriture placée dans un couvercle de boîte de Petri), des chrysalides et un adulte.

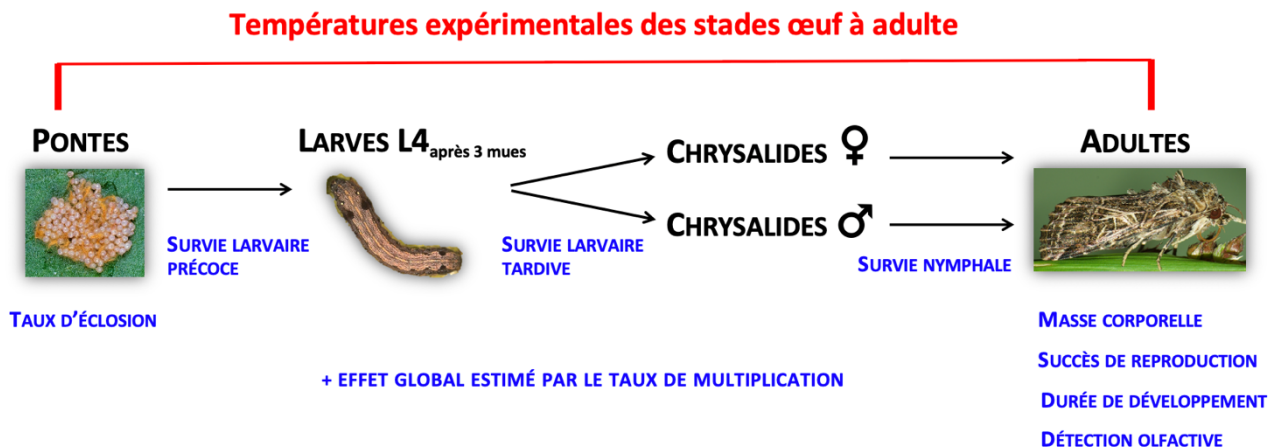
Pour s'accoupler, les femelles émettent une phéromone sexuelle qui attire les mâles dont le composé majoritaire est le (Z,E)9,11-14:OAc. C'est ce composé qui induit la plus forte réponse de détection des mâles (Malo et al. 2000) et qui déclenche tous les items du comportement sexuel (Quero et al. 1996).

La noctuelle du coton est considérée comme nuisible. En effet, après que les femelles aient pondu leurs œufs sous les feuilles d'une plante hôte, les larves qui éclosent s'en nourriront et causeront des dégâts aux feuilles, bourgeons ou même aux fruits. Divers moyens de lutte sont mis en place tels que le piégeage par phéromone, la confusion sexuelle avec la phéromone pour perturber la recherche des femelles par les mâles, l'utilisation de parasitoïdes ou encore le ramassage des œufs dans certains pays. Cependant les populations de ce ravageur restent malgré tout principalement régulées par des insecticides qui sont pulvérisés lors de l'observation de jeunes larves sur les plantations. Ce timing des traitements vise à éviter l'essentiel des dégâts aux cultures dûs aux deux derniers stades larvaires (Khafagi et al. 2016).

Pour des températures constantes, cette espèce n'est plus capable de se reproduire à partir de 30°C (Sidibé et Laugé 1977). Actuellement, l'expansion de *S. Littoralis* sur sa limite géographique nord est surtout limitée par les températures basses de l'hiver. Le réchauffement climatique actuel pourrait lever cette barrière et entraîner une remontée de l'espèce vers le nord, ce qui lui permettrait de continuer son expansion en Europe, et notamment en France. Là où *S. Littoralis* est déjà présente, l'élévation des températures pourrait aussi accroître son nombre de générations annuelles, ce ravageur pouvant avoir de 2 à 7 générations par an selon les conditions environnementales (Khafagi et al. 2016). Cet effet du réchauffement climatique devrait étendre les périodes d'infestation des cultures ainsi que l'abondance du ravageur (Altermatt 2010). Tant du fait du réchauffement climatique que de la grande surface du globe sur laquelle on trouve la noctuelle du coton, cette espèce fait et fera face à des conditions climatiques très diverses, aussi bien pour la température moyenne que pour les fluctuations saisonnières et journalières.

## Chapitre III. Méthodologie

L'ensemble de mes travaux ont porté sur l'influence de la température de développement sur les traits d'histoire de vie (survie, vitesse de développement, croissance, reproduction, masse corporelle), ainsi que sur la capacité à détecter une odeur (Figure 11). L'effet global des facteurs expérimentaux testés (températures de développement, traitements insecticides) a également été prédit par des estimations du taux de multiplication de *S. littoralis* sur la base d'une modélisation du cycle de vie de l'espèce (Logiciel ULM (Ferrière et al. 1996; Legendre et Clobert 1995). Une présentation de la méthode a lieu dans l'article Massot et al. 2021 du chapitre IV.



**Figure 11** : Schéma général des expérimentations réalisées dans la thèse en vue d'étudier les effets de la température de développement. Les paramètres estimés sont indiqués en bleu. A noter que tous les paramètres n'ont pas été mesurés dans toutes les expérimentations.

L'étude conjointe de multiples paramètres a été privilégiée dans la plupart de mes expérimentations dans la mesure où les effets de la température peuvent varier entre les différents paramètres d'une même espèce (Mordecai et al. 2019, Sinclair et al. 2016), que ce soit dû à des différences de température optimale ou de températures critiques. Les expérimentations ont pour l'essentiel été basées sur de grands effectifs nécessaires à l'étude d'effets interactifs assez exigeants en termes de puissance statistique des tests (*e.g.*, test des normes de réaction familiales aux interactions entre la température et les traitements insecticides - chapitre IV).

## Accouplements contrôlés

Il a été décidé d'identifier et de contrôler les possibles effets liés à la ponte d'origine des individus suivis dans mes expérimentations. Pour identifier les pontes d'origine des individus suivis, il a été nécessaire de réaliser des accouplements contrôlés cad un seul male versus une seule femelle. Pour chaque expérimentation, j'ai aussi réalisé des accouplements sur plusieurs semaines afin de quantifier la variabilité selon les dates de ponte qui a déjà été observé au sein de l'élevage.

Pour effectuer les accouplements contrôlés, un mâle et une femelle sélectionnés aléatoirement le lendemain de leur émergence étaient pesés et mis ensemble dans une boîte d'accouplement de 10 cm de diamètre (Figure 12). Le tour de la boîte était recouvert de papier filtre pour servir de support à la ponte et permettre son prélèvement. Dans cette boîte, un bouchon rempli d'eau sucrée (20g/L) était également disposé afin d'alimenter les adultes. La boîte d'accouplement était ensuite placée à 23°C (dans la continuité de la température standard de l'élevage du laboratoire) et je récupérais les pontes 24h après le début de l'accouplement. Cette durée d'une journée permet d'arriver au pic de la ponte (Kehat et Gordon 1975) et d'éviter une hétérogénéité possible de la qualité des œufs liée à la séquence de ponte ou à l'âge des parents.

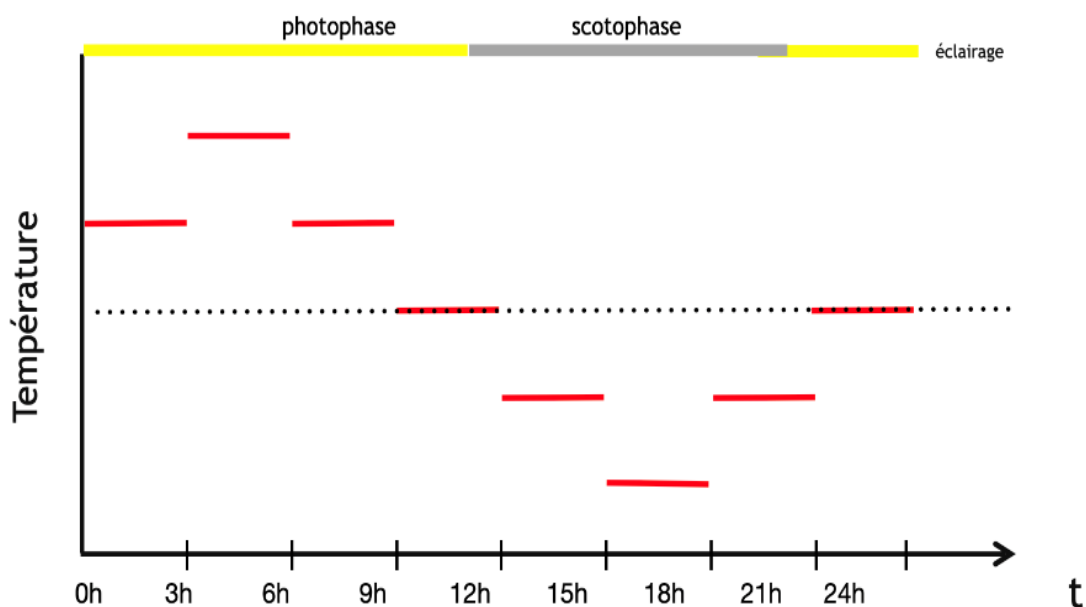


**Figure 12** : Photos d'une boîte d'accouplement. Sur la partie de gauche, le mâle et la femelle sont en train de s'accoupler. Sur la photo de droite, la femelle est en train de déposer des œufs sur le papier filtre.

## Préparation et incubation des pontes

Chaque ponte récoltée était identifiée et séparée en deux parties égales. Ces parties étaient alors pesées pour en estimer le nombre d'œufs (Cf. protocole « Estimation des nombres d'œufs » présenté plus loin). Le design expérimental de séparer chaque ponte en deux parties permet de tester les normes de réaction liées aux pontes en réponse aux facteurs expérimentaux testés, et ainsi de comparer la réponse d'une même ponte pour des conditions de température ou des traitements insecticides.

Pour suivre le développement des œufs, larves et chrysalides à différentes températures de développement, les pontes étaient placées dans des enceintes climatiques (Panasonic MLR-352H, France) permettant de contrôler indépendamment la température et l'hygrométrie (fixée à 70%) avec un cycle d'éclairage jour/nuit (16/8h). Pour les expérimentations ayant eu lieu avec des températures journalières fluctuantes (chapters V et VI), la plage de programmation sur 24h pouvait être divisée en huit segments, ce qui m'a permis de faire varier la température toutes les trois heures (Figure. 13).



**Figure 13** : Programmation des enceintes climatiques pour la fluctuation de température en séquences de trois heures sur un créneau de 24h.

## Suivi des pontes au cours du développement

Dans les enceintes climatiques, les pontes étaient placées dans des boîtes d'élevages en plastique de 225 x 145 x 72 mm, avec un filet sur la partie supérieure pour éviter la condensation d'eau dans les boîtes, notamment avec les températures les plus élevées. Après l'éclosion des œufs, les larves étaient suivies et nourries *ad libitum* jusqu'au quatrième stade larvaire (larve L4 montrée dans la Figure 14).



**Figure. 14** : Larves de *Spodoptera littoralis*. De gauche à droite : Larve entre le stade L4 et le stade L5 reconnaissable à sa couleur noire et sa tête claire. Larve au stade L4, reconnaissable à sa couleur gris/beige et ses deux points noirs. Larve au stade L3 reconnaissable à sa petite taille, sa couleur blanche et ses deux points noirs.

A ce stade, je régulais la densité dans les boîtes (lots de 15 larves) afin de maintenir les individus dans de bonnes conditions (forte croissance pondérale des larves après le stade L4) jusqu'à la fin de leur développement. Les larves sélectionnées (sélection au hasard) étaient placées dans une boîte équivalente à la précédente mais avec un lit de vermiculite (Figure 10 et 15). Les larves non sélectionnées étaient congelées afin de procéder ultérieurement à des comptages pour permettre l'estimation de la survie larvaire précoce (entre l'éclosion et le stade L4), du pourcentage d'éclosion des œufs (nécessité d'un recensement complet des larves écloses) ou encore de la taille de ponte. Quant aux larves sélectionnées, elles étaient suivies et nourries jusqu'à leur passage en chrysalide. La figure 15 montre des vues des boîtes expérimentales et de leur disposition dans les enceintes climatiques.

**A****B****C****D**

**Figure 15 :** Photos d'une enceinte climatique et de boîtes expérimentales utilisées lors de mes travaux. A : Enceinte climatique Panasonic MLR-352H. B : Disposition des boîtes d'élevage à l'intérieur des enceintes climatiques. C : Boîte d'élevage avec un filet sur la partie supérieure pour éviter la condensation d'eau. D : Intérieur d'une boîte d'élevage où les larves sont disposés sur de la vermiculite, avec un bloc de nourriture.

## **Sexage et suivi des chrysalides jusqu'à l'émergence**

Au stade chrysalide, je déterminais leur sexe sur la base du dimorphisme morphologique entre mâles et femelles (Figure 9, chapitre II). Une fois le sexe déterminé, les chrysalides mâles étaient séparées des femelles et placées dans une étuve différente. Ceci était particulièrement important pour l'étude de l'olfaction du chapitre VI où les mâles ne doivent pas avoir été en contact avec la phéromone sexuelle des femelles pour ne pas biaiser leur réponse à ce stimulus. Les boîtes de chrysalides étaient suivies quotidiennement afin de surveiller les émergences des adultes. En plus de noter la date d'émergence pour calculer la durée de développement des individus, ceci permettait de faire des mesures et analyses à un âge fixé (mesures de poids et du succès de reproduction, tests d'olfaction).

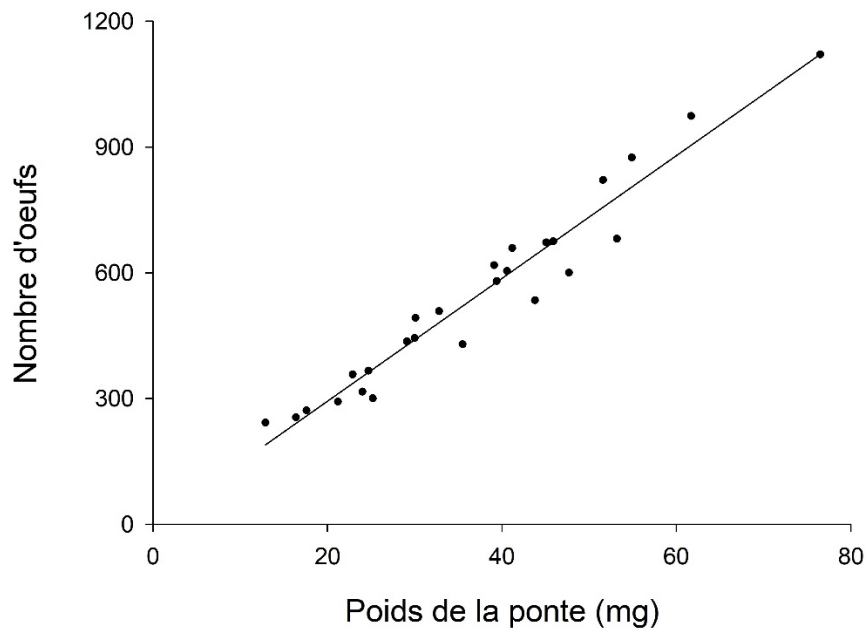
## **Estimation des nombres d'œufs**

Pour estimer le nombre d'œufs initialement présents dans les pontes ou des parties de pontes, j'ai établi un protocole à partir de 26 pontes entières qui ont été pesées avec le papier filtre sur lequel elles avaient été pondues. Ces pontes ont ensuite été incubées à 23°C, une température où la mortalité des œufs et larves est quasi nulle sur la courte durée d'incubation des œufs. Très rapidement après l'éclosion, je comptais les larves et les œufs non éclos. Je pesais également les papiers filtres après les avoir nettoyés des restes d'œufs éclos et d'écaillés des ailes des géniteurs. Ce poids du papier filtre était soustrait au poids initial de la ponte sur son support papier afin d'obtenir le poids de la ponte. Ce protocole a permis de montrer une relation étroite entre le poids de la ponte et le nombre d'œufs de la ponte (Figure 16).

Ce protocole qui permet donc d'estimer le nombre d'œufs des pontes ou de parties de pontes a été utilisé afin d'estimer le taux d'éclosion et la survie larvaire précoce de mes pontes expérimentales. A noter que dans mes expérimentations avec des température d'incubation entre 25°C et 33°C, les pontes étaient toujours obtenues à 23°C (dans la continuité de la température de l'élevage du laboratoire) et quelles



étaient rapidement pesées et placées à la température expérimentale choisie. Ceci était fait pour que la température d'incubation ne puisse pas influencer sur le poids initial de la ponte et biaiser l'estimation du nombre d'œufs. Des papiers filtres sans ponte ont également été pesés et n'ont montré aucune variation de poids selon les températures d'incubation. Le poids des écailles déposées sur la ponte par la femelle pour la protéger a quant à lui été négligeable.



**Figure 16.** Détermination du nombre d'œufs à partir du poids de la ponte. Nombre d'œufs =  $0,492 + 14,645 \times \text{Poids de la ponte}$  ;  $R = 0,97$  et  $N = 26$ . La relation a été significative ( $P < 0,001$ ) et l'ordonnée à l'origine non significativement différente de 0 ( $P = 0,987$ ).

## Mesure du poids sec

Mes études sur la température de développement ont notamment visé à déterminer les effets sur la masse corporelle. Dans la mesure où ces effets ont pu pour partie être dépendants de variations de contenu en eau, j'ai testé cette possibilité dans une expérimentation en estimant le poids sec des individus (chapitre Vc). Pour ce faire, j'ai mis au point un protocole pour l'estimation du poids sec. Des papillons ont été placés dans des tubes Eppendorf (de poids connu) et puis pesés. Les papillons ont par la suite été congelés puis placés au four pendant 6h à 130°C.

## Traitements insecticides

Pour les expérimentations sur la sensibilité aux insecticides, les larves ont été prélevées au stade L4, et réparties par lot de 15. Les traitements ont été réalisés par voie topique, où 0,5  $\mu$ L de solution étaient déposés sur la tête des larves à l'aide d'un micro applicateur (Seringue Hamilton de 25 $\mu$ L). Une fois les traitements réalisés, les larves ont été replacées dans une boîte d'élevage pour suivre les effets des traitements sur les différents paramètres (survie larvaire, survie nymphale, durée de développement, masse corporelle...).

## Électroantennographie (EAG)

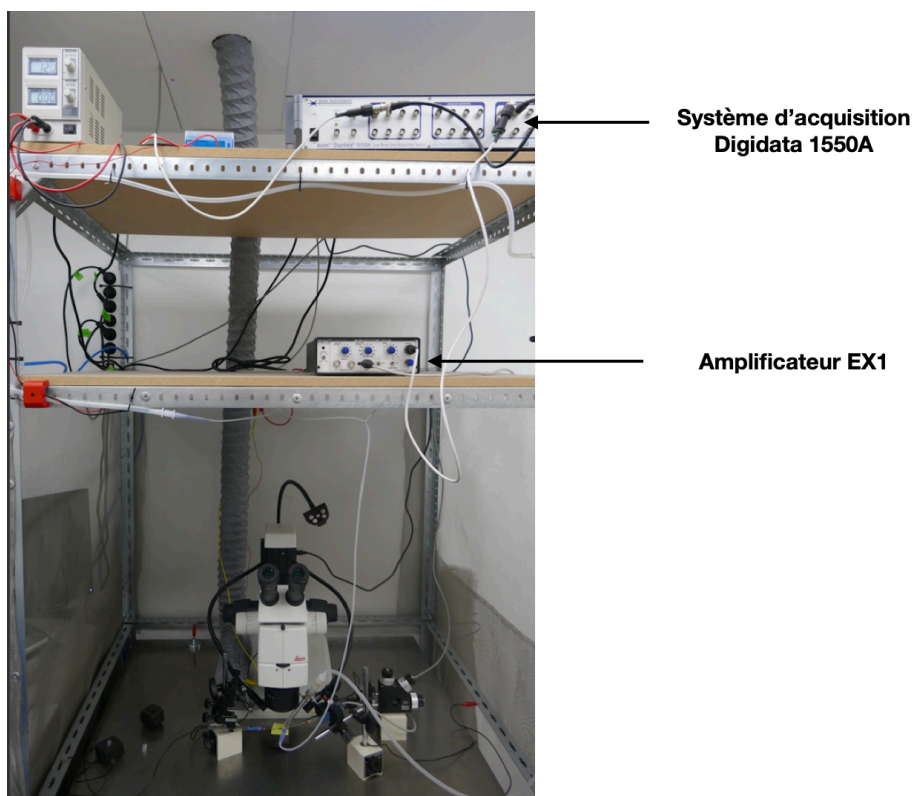
Pour étudier l'effet de la température sur la détection olfactive de *S. littoralis* j'ai utilisé la technique d'électroantennographie, c'est-à-dire que j'ai mesuré l'activité électrique globale de l'antenne après l'avoir stimulée avec un odorant. J'ai testé 5 odeurs de plantes, ainsi que le composé majoritaire de la phéromone sexuelle des femelles, (chapitre VI).

Pour cette étude, des papillons ont été élevés (voir les étapes méthodologiques précédentes) avec deux régimes de températures fluctuantes : avec des températures moyennes de 25 et 33 °C et une fluctuation journalière de 10°C ( $\pm$  5°C autour de la température moyenne).

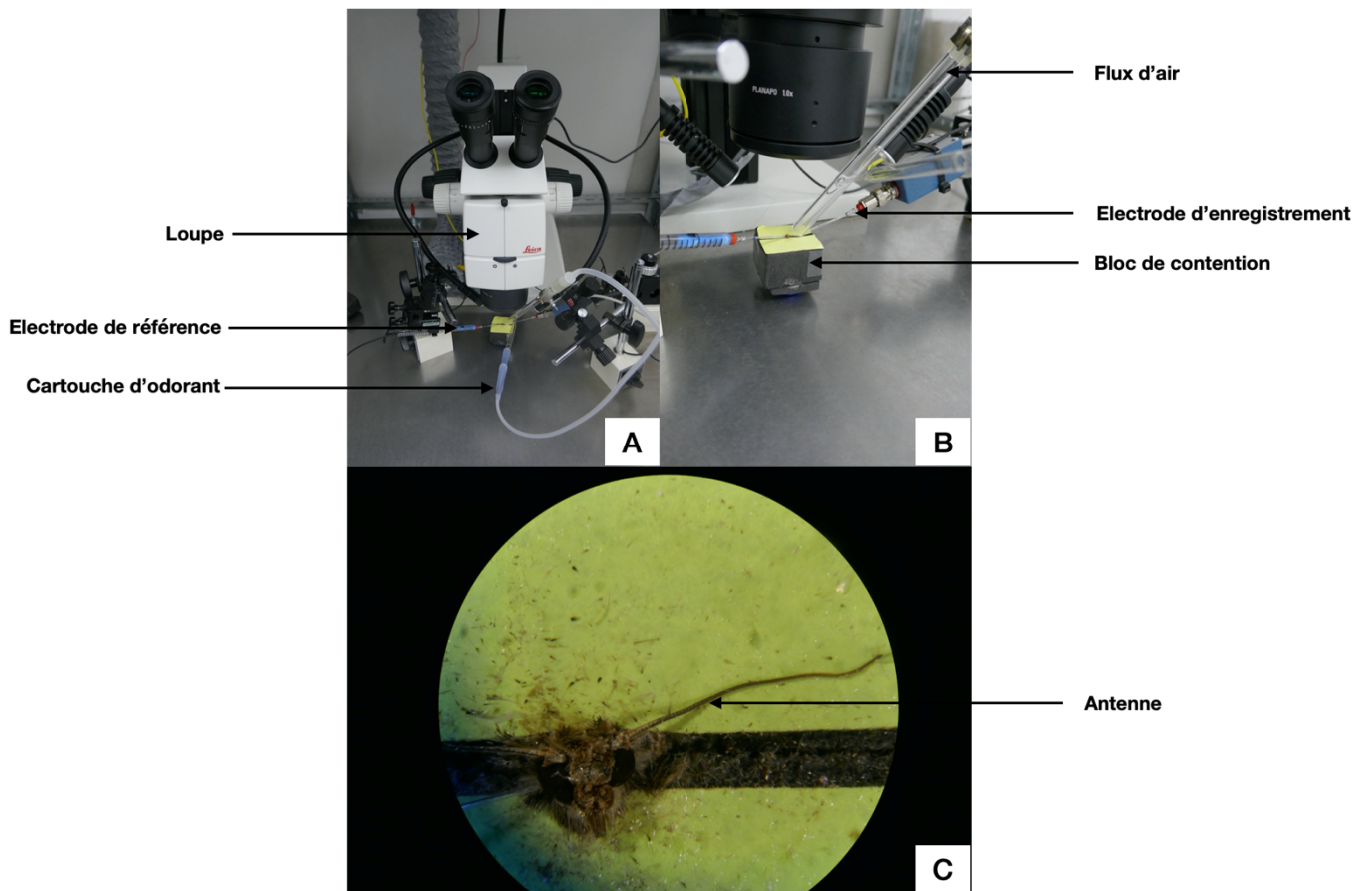
Les émergences des adultes ont été vérifiées tous les jours et les adultes récupérés ont été identifiés et isolés avec de l'eau sucrée à disposition pendant 24h. Le lendemain, je les ai pesés juste avant de réaliser les enregistrements EAG. Les photos des figures 17 et 18 montrent le matériel que j'ai utilisé pour mes mesures d'EAG. Les papillons étaient mis en contention dans un bloc de mousse, en ne laissant dépasser que le haut de la tête, avec les yeux et les antennes en évidence. Pour les enregistrements, j'ai utilisé des électrodes avec des capillaires de verre remplis d'une solution de Ringer (NaCl 120mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, HEPES 10 mM, pH 6,5). L'élec-

trode de référence était insérée dans un œil, tandis que le bout de l'électrode d'enregistrement était mis au contact de l'antenne, sur laquelle était ajoutée une goutte de gel conducteur (SPECTRA 360, Parker Laboratories Inc.). Les enregistrements ont été amplifiés x500 à l'aide d'un amplificateur EX1 (Dagan, USA) et contrôlés par un ordinateur en utilisant un système d'acquisition Digidata 1550A contrôlé par le logiciel Clampex 10 (Molecular Devices).

Un flux d'air constant avec un débit de 2 litres par minute (LPM) était dirigé vers l'antenne testée. C'est dans ce flux d'air que je pouvais disposer le bout d'une pipette pasteur contenant un papier filtre imbibé de 10 $\mu$ L d'un odorant. Le stimulus de l'odorant sur l'antenne était provoqué par un pulse d'air de 0,5 seconde à 0,5 LPM au travers de la pipette, déclenché par une vanne contrôlée par l'ordinateur. Entre chaque cartouche d'odorant testé, une minute de récupération était laissée à l'animal. Les cartouches d'odorants utilisées étaient préparées chaque jour. Les odeurs de plante étaient diluées dans de l'huile de paraffine, tandis que la phéromone était diluée dans de l'hexane.



**Figure 17** : Poste d'électroantennographie du laboratoire que j'ai utilisé lors de la thèse.



**Figure 18** : Détails du poste d'électroantennographie. La photo A est centrée sur la loupe. La photo B est centrée sur le bloc dans lequel le papillon est mis en contention. La photo C est centrée sur la tête de l'animal.

## Chapitre IV. Effets de la température sur la sensibilité aux insecticides

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'influence de la température sur les effets de deux insecticides, la deltaméthrine et le chlorpyrifos, sur différents paramètres du cycle de vie de *S. littoralis*. Ce type d'étude est primordial car, dans un contexte de changement climatique, il est important que les études en écotoxicologie s'intéressent aux modifications potentielles de la toxicité des insecticides sur leurs cibles en fonction de la température. En effet, il y a déjà dans la littérature des éléments qui montrent des modifications de toxicité selon la température, surtout sur des organismes ectothermes tels que les insectes chez lesquels la température a un impact direct sur leur métabolisme. Différents mécanismes peuvent rentrer en jeu dans ces modifications de toxicité par la température comme la modification des taux d'ingestion et d'excrétion des organismes pouvant modifier la quantité et le temps de passage des substances dans l'organisme (Hooper et al. 2013; Noyes et al. 2009), la biotransformation des molécules insecticides en dérivés de toxicités différentes (Hooper et al. 2013; Noyes et al. 2009), ainsi qu'une modification de l'activité des enzymes de détoxification qui comme toutes les enzymes sont dépendants de la température (Angilletta 2009; Kingsolver 2009).

Pour mes travaux, nous avons choisi deux insecticides dont des études avaient déjà montré des modifications de toxicité en fonction de la température. Ces deux insecticides appartiennent à des familles différentes : la deltaméthrine est un pyréthri-noïde et le chlorpyrifos un organophosphoré. Ces insecticides ont été aussi choisis pour leurs possibles réponses opposées à la température. La deltaméthrine était attendue moins efficace avec une augmentation de température comme observé chez *S. littoralis* entre des températures de 20 et 35°C (Riskallah 1984), alors qu'à l'inverse, un organophosphoré comme le chlorpyrifos était prédit plus toxique à température plus élevée, comme certaines études l'ont montré selon différents écarts de température entre 10 et 34°C (Lydy et al. 1999; Meng et al. 2020; Tran et al. 2018). Cependant, il y a un manque d'études sur cette interaction entre insecticides et température. En effet,

d'autres facteurs peuvent moduler les variations de la toxicité des insecticides selon la température. Comme illustré par deux de nos articles mis en annexes A et B, la toxicité des insecticides peut par exemple être liée à l'âge et au sexe des individus (Malbert-Colas et al. 2020) et même aux effets transgénérationnels (Bagni et al. 2020). L'étude de l'influence des effets transgénérationnels sur l'interaction entre insecticides et température a ainsi été la question clé des études présentées dans les deux parties qui suivent

## **A. Effets de la température sur la sensibilité à la deltaméthrine**

Dans cette partie qui se présente sous la forme d'un article, nous avons étudié les effets de la température sur la sensibilité des paramètres du cycle de vie de *S. littoralis* à la deltaméthrine. L'étude a considéré quatre températures proches de l'optimum thermique de l'espèce (23, 25, 27 et 29°C) et trois concentrations de deltaméthrine (0,076, 0,76 et 5,05 mg/L, traitements qui ont été comparés à un traitement contrôle) correspondant à de faibles doses estimées pour des adultes (Lalouette et al., 2016) et ayant démontré différents niveaux de mortalité sur les stades larvaires (Malbert-Colas et al., 2020).

Les enjeux de cette étude étaient multiples. Tout d'abord, les effets déjà montrés de la température sur l'efficacité des insecticides, et notamment chez *S. littoralis*, étaient basés sur des écarts de température très importants. Nous voulions donc tester si la modification de l'effet de la deltaméthrine se retrouvait sur une gamme de températures moins large. De plus, les études se concentraient généralement sur la survie des organismes testés. Nous voulions ici nous intéresser à comment pouvait réagir un ensemble de paramètres clés du cycle de vie de *S. littoralis* aux effets croisés de la température et de la deltaméthrine. Les paramètres testés ont été la survie larvaire, la durée de développement, la survie nymphale, la masse corporelle des chrysalides et le taux de multiplication de populations simulées sur la base des paramètres mesurés. Enfin, nous voulions tester l'influence d'effets transgénérationnels dans la mesure où la sensibilité aux insecticides de l'espèce d'étude est sensible aux effets maternels,

comme cela a été montré dans un de mes articles mis en Annexe A (Bagni et al., 2020). Ceci a été fait par l'emploi d'un plan expérimental factoriel où chaque ponte utilisée était séparée en deux parties pour être suivie à deux températures différentes. Pour chacune des parties de ponte, différents lots de larves étaient soumis aux différents traitements insecticides (Figure 1 de l'article qui suit). Cette approche a permis de tester les normes de réaction inter-familiales entre les pontes pour la température, la delta-méthrine et leur interaction.

L'article de cette partie "Combined influences of transgenerational effects, temperature and insecticide on the moth *Spodoptera littoralis*" a été publié en 2021 dans le journal **Environmental Pollution**.

## Combined influences of transgenerational effects, temperature and insecticide on the moth *Spodoptera littoralis*

Manuel Massot, Thibaut Bagni, Annick Maria, Philippe Couzi, Thomas Drozd, Aude Malbert-Colas, Martine Maïbèche, and David Siauxsat

Sorbonne Université, CNRS, INRAe, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, iEES-Paris, F-75005, Paris, France

**ABSTRACT.** Climate warming is expected to impact the response of species to insecticides. Recent studies show that this interaction between insecticides and temperature can depend on other factors. Here, we tested for the influence of transgenerational effects on the Insecticide x Temperature interaction in the crop pest moth *Spodoptera littoralis*. Specifically, we analysed reaction norms among experimental clutches based on a split-plot design crossing the factors temperature, insecticide and clutch. The study was performed on 2280 larvae reared at four temperatures (23, 25, 27 and 29°C), and their response to the insecticide deltamethrin (three concentrations and a control group) was tested. Temperature had a global influence with effects on larval survival, duration of development, pupal body mass, and significant reaction norms of the clutches for temperature variations of only 2°C. In addition to the expected effect of deltamethrin on mortality, the insecticide slightly delayed the development of *S. littoralis*, and the effects on mortality and development differed among the clutches. Projection models integrating all the observed responses illustrated the additive effects of deltamethrin and temperature on the population multiplication rate. Variation in the response of the clutches showed that transgenerational effects influenced the impact of insecticide and temperature. Although no evidence indicated that the Insecticide x Temperature interaction depended on transgenerational effects, the studies on the dependence of the Insecticide x Temperature interaction on other factors continue to be crucial to confidently predict the combined effects of insecticides and climate warming.

**Keywords:** Pesticide, reaction norm, mortality, development, projection models



## INTRODUCTION

Climate warming is expected to dramatically increase crop losses due to insect pests (Deutsch et al., 2018). As a consequence, we can anticipate greater insecticide use with the associated costs of environmental pollution, biodiversity reduction and evolution of pest resistance. Furthermore, either ecological risk assessment or pest management will need to address the change in response of species to insecticides with rising temperature (Dinh et al., 2016; Fournier-Level et al., 2016; Hooper et al., 2013; Noyes et al., 2009). Although the focus on this interaction between insecticides and temperature is recent, several kinds of changes are expected. It is known that rising temperatures generally increase the uptake and excretion of insecticides and pollutants (Hooper et al., 2013; Noyes et al., 2009). Most of these responses are likely due to the temperature-induced increase in metabolism in ectotherms such as insects (Hooper et al., 2013). We also expect that the activity of detoxification enzymes responds to temperature as classically observed in other enzymes, with enzyme activity increasing with temperature up to an optimum level and then declining sharply (Angilletta, 2009; Kingsolver, 2009). Another possible effect of temperature is a change in insecticide toxicity (Hooper et al., 2013; Noyes et al., 2009). With climate change, all these responses may impact species resistance to insecticides (Fournier-Level et al., 2016).

However, the predictions concerning the Insecticide x Temperature interaction could be refined. In fact, this interaction has been recently shown to depend on other factors (Dinh et al., 2016; Tran et al., 2018; Whiten & Peterson, 2016). In the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae, Linnaeus 1762), Whiten & Peterson (2016) found that the interaction between temperature and permethrin insecticide depends on the temperature itself. The sign of the relationship between temperature and permethrin toxicity reverses along a thermal gradient. In the damselfly *Coenagrion puella* (Odonata, Coenagrionidae, Linnaeus 1758), Dinh et al. (2016) found that the mortality caused by the insecticide chlorpyrifos increases dramatically

in larvae previously exposed to a heat wave and starvation. In the mosquito *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae, Linnaeus 1758), the same research team showed that the interactive effect of warming on mortality caused by chlorpyrifos disappeared in the offspring of parents previously exposed to both warming and insecticide (Tran et al., 2018). In this context, we aimed to test for transgenerational effects on the Insecticide x Temperature interaction in another insect model, the crop pest moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae, Boisduval 1833). It is especially justified to investigate transgenerational effects on the Insecticide x Temperature interaction in *S. littoralis* because a maternal effect on sensitivity to an insecticide was recently detected in this species. The mortality caused by chlorpyrifos is indeed higher in larvae of larger mothers (Bagni et al., 2020). Such transgenerational dependence is expected to be common because offspring quality often depends on parental traits (Marshall et al., 2010; Moore et al., 2019; Mousseau et al., 2009). Here we tested transgenerational effects on the Insecticide x Temperature interaction by analysing reaction norms among experimental clutches. Specifically, we tested clutch effects, *i.e.*, variation in the response of families based on a survey of full siblings. In another moth species, *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera, Saturniinae, Guérin-Meneville 1868), variation among families explains a large part of the variation in larval survival and growth rates, 31 and 45% of the total variation observed, respectively (Agosta, 2008). Moreover, Kingsolver et al. (2004) provides an illustrative example of thermal reaction norm in the butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae, Linnaeus 1758), with a variation in the response of families for larvae reared under different temperatures.

We performed the study with the insecticide deltamethrin, which is one of the most used synthetic pyrethroids worldwide (WHO, 1989). Pyrethroids display high efficacy on targeted insects and decreased toxicity on non-targeted vertebrates (Bradbury & Coats, 1989; Goulding et al., 2013). This molecule induces toxic responses in the central and peripheral nervous systems of insects by interacting with voltage-gated sodium channels (Haug & Hoffman, 1990). Pyrethroids are classified

into two types. Type 1 and some type 2 pyrethroids are less toxic at elevated temperatures, but some type 2 pyrethroids are more toxic at elevated temperatures (Hooper et al., 2013). Deltamethrin is a type 2 pyrethroid, but a previous study on larvae of *S. littoralis* showed that it is less toxic at an elevated temperature (Riskallah, 1984). Larvae are the main target of insecticides in *S. littoralis*, and deltamethrin has the highest toxicity early in the development of *S. littoralis*, especially at the 4<sup>th</sup> instar studied by Riskallah (Malbert-Colas et al., 2020). The study of Riskallah (1984) tested the toxicity of deltamethrin at two temperatures, 20 and 35°C. However, it has been recommended to investigate smaller variations in temperature to capture the nonlinear influence of temperature on most biological processes (Mordecai et al., 2019; Sinclair et al., 2016). Furthermore, searching the effects of smaller temperature variations is consistent with the expected climate warming. Therefore, we aimed to test the responses between four close temperatures: 23, 25, 27 and 29°C. Experimental temperatures were applied during all development stages, *i.e.*, from eggs to adult emergence. We chose these temperatures near the thermal optimum of *S. littoralis* because species responses to temperature are more accurately measured near their thermal optima (Johnson et al., 2015). In a preliminary study to determine the thermal optimum of *S. littoralis*, we found the highest population multiplication rate at temperatures of 27 and 29°C (Fig. S1). Moreover, a temperature of 30°C is known to induce high pupal mortality and inhibit reproduction in both sexes (Sidibé & Laugé, 1977).

To test the Insecticide x Temperature interaction, we used a split-plot design crossing four temperatures with four deltamethrin treatments. The moth traits investigated were larval survival, pupal survival, duration of development, and pupal body mass. To synthesise the effect of temperature on multiple traits as advised (Bruijning et al., 2018; Mordecai et al., 2019), we performed population projection models. The global response was assessed based on estimates of the asymptotic growth rate obtained from matrix modelling of the *S. littoralis* life cycle. This

approach allowed us to evaluate the relative importance of the response of the different moth traits tested. With regard to Riskallah's study (1984) that found a decreased deleterious effect of deltamethrin on larval survival between 20 and 35°C, we will determine (i) if the decrease in the deleterious effect of deltamethrin is also observed between less extreme temperatures, (ii) if effects on moth traits other than larval survival mask this response, and (iii) crucially, if this Insecticide x Temperature interaction is sensitive to transgenerational effects.

## MATERIALS AND METHODS

### Study system

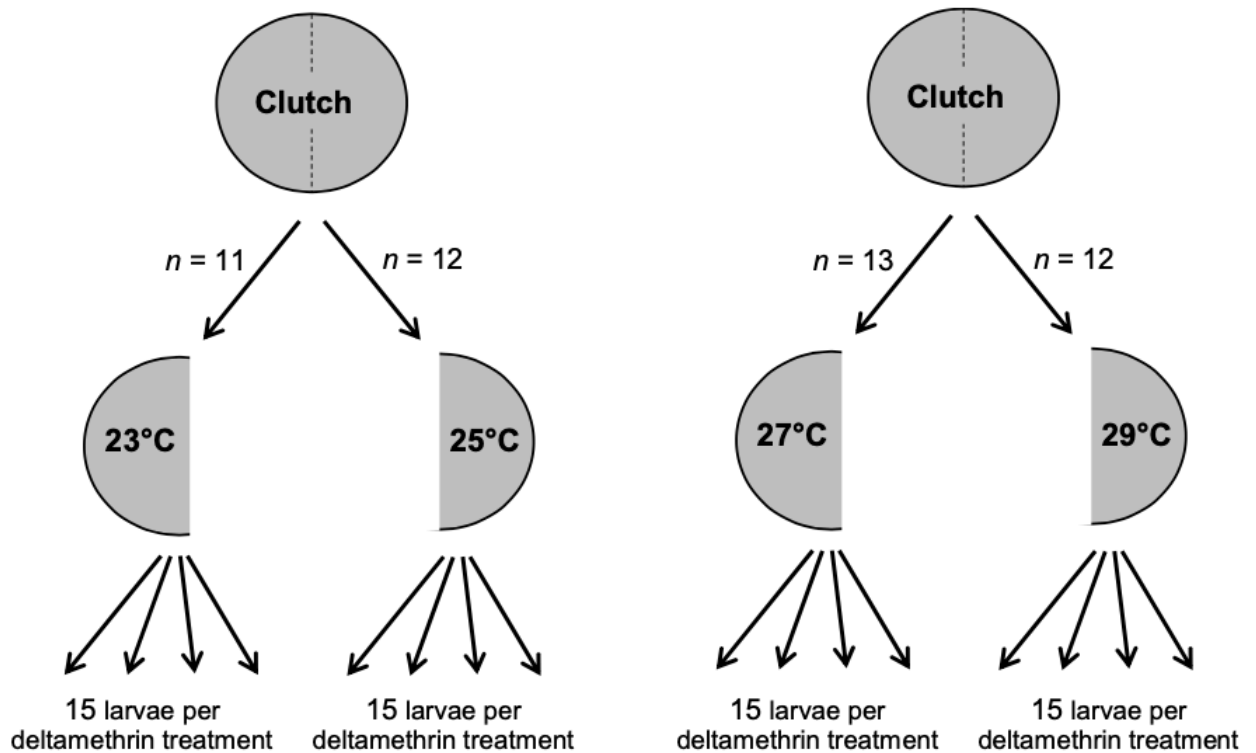
We studied the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*, a major pest insect. The larvae of this African and Mediterranean moth damage 87 plant species of economic importance such as cotton, maize, and tomato (CABI, 2020), making this species one of the most destructive agricultural pests. *S. littoralis* can complete two to seven generations per year (Khafagi et al., 2016). Larval development is complete with six or seven instars (depending on environmental conditions) (Baker & Miller, 1974), and the last two larval instars induce approximately 90 to 95% of plant defoliation (Khafagi et al., 2016). A laboratory strain of *S. littoralis* was used, with larvae reared on a semiartificial diet (Hinks & Byers, 1976), at 23°C, 60-70% relative humidity, and a 16:8 light/dark cycle until adult emergence. Individuals were sexed as pupae.

To choose experimental temperatures, we performed a preliminary study in spring 2017 with four temperatures (23, 25, 27 and 29°C) that were applied from eggs to adult emergence. As in our main experiment, the relative humidity was 60-70%, and the light/dark cycle was 16:8. We measured the early larval survival rate (between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars), late larval survival rate (between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation), pupal survival rate, and developmental times (duration of incubation, between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars, between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, and between pupation and adult emergence). Based on these data, we estimated the

multiplication rate of our *S. littoralis* strain for each developmental temperature and found optimal developmental temperatures at 27 and 29°C (Fig. S1).

## Experiments

Experimental clutches were obtained from mating pairs of 1 female and 1 male, with two- or three-day-old adults. Mating occurred in round plastic boxes (10 cm in diameter) with sugar water (20 g/L) as a food source and a strip of filter paper as a laying medium. We collected clutches only 24 hours after mating, *i.e.*, at the peak of egg laying (Kehat & Gordon, 1975) to limit variation in offspring quality. Clutches were collected at 14 days of 5 weeks, from 5<sup>th</sup> February to 13<sup>th</sup> March 2018. Figure 1 shows the split-plot design we used to test the response of clutches to temperature and deltamethrin insecticide, *i.e.*, the reaction norms of clutches to the two experimental factors. To carry out this experiment, most clutches collected were immediately divided into two parts to rear them under different temperatures (clutches reared at 23 or 25°C, and clutches reared at 27 or 29°C). Temperature was controlled independently of relative humidity (fixed to 70%) with environmental test chambers (Panasonic MLR-352H). When larvae were at the 4<sup>th</sup> instar, each of the half-clutches was divided into four groups where the deltamethrin treatments were applied. We treated 15 larvae in each deltamethrin group of half-clutches (Fig. 1). The test solutions were prepared from an initial solution of 5,052 mg of deltamethrin (45423, Sigma Pestanal, France) dissolved in 1 mL of absolute ethanol. Serial dilutions with ethanol were then made from this overconcentrated solution.



**Fig. 1.** Experimental design used to test the reaction norms of clutches to temperature and deltamethrin insecticide. Most clutches were divided into two parts to rear them under two different temperatures, and each of these half-clutches was divided into four groups where the deltamethrin treatments were applied (3 concentrations and 1 control solution). Overall, 2880 larvae were individually treated with insecticide solution at their 4<sup>th</sup> instar.

Our final concentrations of the treatments were obtained by diluting these solutions with pure hexane. Hexane was used as a solvent because deltamethrin is an apolar insecticide with a low solubility in polar solvents such as water or ethanol. The high volatility of hexane is also an advantage for topical application since the solvent quickly dissipates. Our treatments were compared to a control group treated with a solution of 15% ethanol and 85% hexane. This ratio was chosen because it corresponded to the highest quantity of ethanol in our treatment solutions. The solution of the control group had no or a very low toxicity as shown in previous studies of *S. littoralis* (Lalouette et al., 2016; Malbert-Colas et al., 2020). Topical applications of 0.5  $\mu\text{L}$  of the test solutions to the head of larvae were performed using a microapplicator (Hamilton 25  $\mu\text{L}$  syringe and Hamilton dispenser). The

concentrations of deltamethrin tested were 0.076, 0.76 and 5.05 mg/L as in previous studies (Lalouette et al., 2016; Malbert-Colas et al., 2020), and these concentrations corresponded to doses of 0.038, 0.380 and 2.525 ng of deltamethrin per larva, respectively. Under a developmental temperature of 23°C, our highest concentration of deltamethrin (5.05 mg/L) applied at the beginning of the 4<sup>th</sup> larval instar led to the mortality of all larvae (Malbert-Colas et al., 2020). Our intermediate concentration of deltamethrin (0.76 mg/L) led to either 95% mortality in the main experimental series or 31% mortality in a complementary experiment (Malbert-Colas et al., 2020). This result showed that the limit between high and low mortality effects at the 4<sup>th</sup> larval instar was very close to our intermediate deltamethrin concentration. Our lowest concentration of deltamethrin (0.076 mg/L) did not induce significant mortality (mortality rate of 15% that did not differ from a control group). In addition to our intermediate concentration, we chose to retain the lowest and highest deltamethrin concentrations in our study because their impact might change with temperature.

After the insecticide treatment, each group of 15 larvae was reared until pupation in experimental plastic boxes of 225 x 145 x 72 mm, with a net on the top of boxes. Overall, the experiment was performed on 2880 larvae reared in 192 experimental boxes (one per combination crossing the factors clutch, temperature and deltamethrin treatment). Experimental boxes were checked daily to monitor larvae and pupae until adult emergence. This survey allowed us to estimate developmental time, larval survival, and pupal survival. Developmental time was defined as the duration between the deltamethrin treatment (at the 4<sup>th</sup> larval instar) and adult emergence. We measured larval survival between the deltamethrin treatment and pupation. All larvae that survived until pupation were sexed to differentiate pupal survival of males and females. For each experimental box, we also weighed pupae, two males and two females, to estimate pupal body mass.

## Statistical analyses

Larval survival, pupal survival, developmental time and pupal body mass were analysed in two steps. First, we tested the effects of developmental temperature, deltamethrin, and their interaction. Second, we investigated variation in the response of clutches to temperature and deltamethrin (reaction norms). Our experimental design (Fig. 1) allowed us to test reaction norms for clutches that were divided and reared under two different temperatures (23 and 25°C or 27 and 29°C). Thus, these tests were performed separately for clutches reared at 23 and 25°C and for clutches reared at 27 and 29°C. We modelled the clutch factor with our clutch identification numbers and alternatively with the date of collection of clutches (day or week). Indeed, temporal fluctuations were observed in our rearing (Bagni et al., 2020) and might describe more parsimonious variation among clutches. We compared statistical models with no clutch variation, total variation among clutches, and variation on the date of the collection of clutches. The comparison was based on the AICc of models, *i.e.*, Akaike Information Criterion corrected for small sample size (White & Burnham, 1999). When a variation among clutches was detected (temporal or total variation), we reported the results on the interactions between the selected clutch factor and experimental factors (interactions Temperature x Clutch, Deltamethrin x Clutch, and Temperature x Deltamethrin x Clutch). These interactions tested the variation in the response of clutches to temperature and deltamethrin. We analysed our binomial variables (larval survival and pupal survival) using logistic models. For continuous dependent variables (developmental time and pupal body mass), we used ANOVA in our first analysis limited to temperature and deltamethrin effects. The statistical models used to investigate reaction norms were generalized linear models that included random factors (clutch or date factors) in mixed-effects linear models. We checked the residuals of models for normality and homoscedasticity. Normality and homoscedasticity were not satisfied for developmental time (even log transformed), and we had to use logistic models for this variable. Developmental time was



discretized into a binomial variable. We discretized developmental time with regard to the median values of each experimental temperature to retain variation to test the Temperature x Deltamethrin interaction. Indeed, developmental times overlapped very little between experimental temperatures: the 99% confidence interval of the developmental time between the 4<sup>th</sup> larval instar and adult emergence was 28.6 - 29.1 days at 23°C ( $n = 313$ ), 23.4 - 23.9 days at 25°C ( $n = 345$ ), 19.6 - 20.0 days at 27°C ( $n = 399$ ), and 18.2 - 18.5 days at 29°C ( $n = 398$ ). All analyses were performed with JMP software (JMP Pro 15, SAS Institute Inc., Cary, NC), and all models were simplified by backward stepwise removal of terms with  $P > 0.10$ .

### Projection matrix models

To evaluate the relative importance of the response of the different moth traits tested, we built matrix models to estimate the multiplication rate at the population level (Caswell, 2001). Specifically, we used the asymptotic growth rate (*i.e.*, intrinsic rate of increase) as a proxy for population dynamics (Caswell, 2001; Metcalf & Pavard, 2007). Our models were based solely on females as is usual for this kind of demographic modelling. This approach assumes that male abundance is high enough to ensure reproduction by most females (Bessa-Gomes et al., 2010). This assumption was relevant to our study where 55% of pupae were males. We modelled the life cycle of *S. littoralis* based on an age-structured matrix where each age class was 1 day, and we calculated the population growth rate as the dominant eigenvalue of the matrix. We parameterised this daily matrix model with the vital parameters estimated in the present study (survival between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, pupal survival, duration between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, duration of pupal period, and sex-ratio). We used estimates from our preliminary study in spring 2017 for duration of incubation period and for survival and duration between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars. Adult female survival until laying, laying success after mating, number of eggs laid, and hatching success were obtained from another study (Malbert-Colas et al., 2020). All the values used in the models are given in Table S1. Our modelling was

performed with the computer program ULM ('Unified Life Models') (Ferrière et al., 1996; Legendre & Clobert, 1995). ULM can be downloaded from <http://www.biologie.ens.fr/~legendre/ulm/ulm.html>. This program enabled us to estimate the growth-rate sensitivity and elasticity (*i.e.*, relative sensitivity) to changes in the different vital parameters tested (Caswell, 2001; Ferrière et al., 1996).

## RESULTS

### Effects of temperature and deltamethrin

We first tested the effects of developmental temperature and deltamethrin on larval survival between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, *i.e.*, on the period beginning at the deltamethrin treatment. Larval survival rates differed between deltamethrin treatments ( $\chi^2_3 = 1065.8$ ,  $P < 0.001$ ) and temperatures ( $\chi^2_3 = 15.3$ ,  $P = 0.002$ ), but no interaction was detected between deltamethrin and temperature ( $\chi^2_9 = 6.4$ ,  $P = 0.69$ ). Fig. 2 shows a dramatic decrease in larval survival with the highest deltamethrin concentration of 5.05 mg/L ( $\chi^2_1 = 821.5$ ,  $P < 0.001$  for the test *versus* the control group) and decreased larval survival with the intermediate concentration of 0.76 mg/L ( $\chi^2_1 = 43.4$ ,  $P < 0.001$ ). Larval survival rates did not differ between the lowest deltamethrin concentration of 0.076 mg/L and the control group ( $\chi^2_1 = 0.2$ ,  $P = 0.62$ ). The temperature effect on larval survival was not significant in the control group ( $\chi^2_3 = 0.7$ ,  $P = 0.87$ ) or in the group with the highest deltamethrin concentration ( $\chi^2_3 = 3.0$ ,  $P = 0.39$ ). The temperature effect was significant in the deltamethrin groups with the intermediate concentration ( $\chi^2_3 = 10.1$ ,  $P = 0.018$ ) and the lowest concentration ( $\chi^2_3 = 7.9$ ,  $P = 0.049$ ). Larval survival slightly increased at the warmest temperatures of 27 and 29°C (Fig. 2).

The dramatic decrease in larval survival with the highest concentration of deltamethrin (Fig. 2) led to very small sample sizes (see Table S2d). Consequently, we were unable to include this deltamethrin treatment in the analyses on pupal survival, developmental time until adult emergence, and pupal body mass. Female pupal

survival did not respond significantly to deltamethrin ( $\chi^2_2 = 1.2$ ,  $P = 0.56$ ) and temperature ( $\chi^2_3 = 1.6$ ,  $P = 0.67$ ), or to their interaction ( $\chi^2_6 = 3.4$ ,  $P = 0.76$ ). Similarly, male pupal survival rates did not depend on deltamethrin ( $\chi^2_2 = 2.0$ ,  $P = 0.37$ ) or temperature ( $\chi^2_3 = 3.6$ ,  $P = 0.31$ ), with no interaction between the two factors ( $\chi^2_6 = 8.4$ ,  $P = 0.21$ ). Overall, the pupal survival rates of females and males were constantly high (Fig. S2).

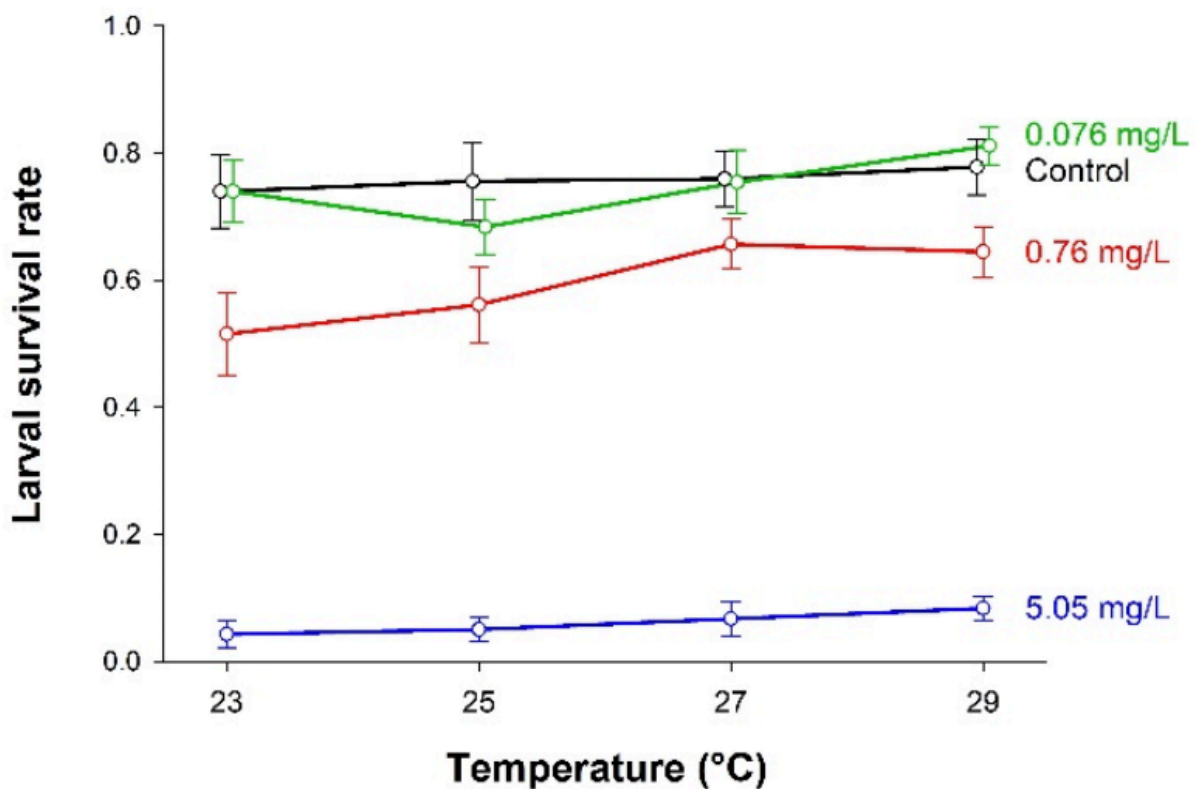
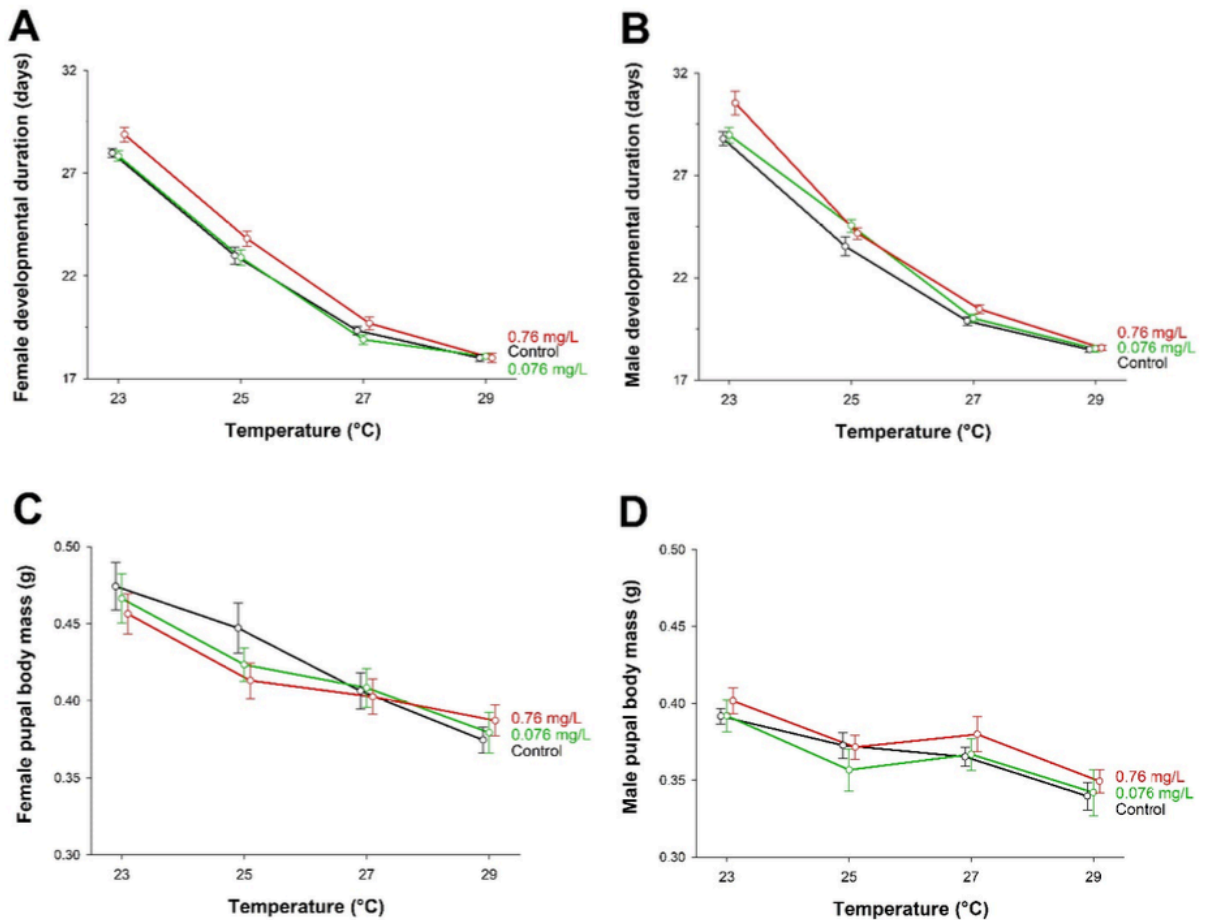


Fig. 2. Effects of temperature and deltamethrin on larval survival rates. Vertical lines represent the s.e.m. between clutches.

Figure 3 shows a dramatic shortening of development at the warmest temperatures in females and males. As previously detailed (see Materials and Methods), the 99% confidence intervals of the developmental time did not overlap between the four experimental temperatures. In addition, the developmental time of females differed significantly between deltamethrin treatments ( $\chi^2_2 = 20.1$ ,  $P < 0.001$ ), with no interaction between deltamethrin and temperature ( $\chi^2_6 = 7.6$ ,  $P = 0.27$ ).

Females had a slight lengthening of their development with the deltamethrin concentration treatment of 0.76 mg/L compared to the control group ( $\chi^2_1 = 9.3$ ,  $P = 0.002$ ; Fig. 3A). The lowest deltamethrin concentration of 0.076 mg/L did not significantly affect female developmental time ( $\chi^2_1 = 2.0$ ,  $P = 0.15$ ). The developmental time of males also differed between deltamethrin treatments but through a significant interaction between deltamethrin and temperature ( $\chi^2_6 = 24.0$ ,  $P < 0.001$ ). Males had a lengthening of their development with the deltamethrin concentration treatment of 0.76 mg/L compared to the control group at temperatures of 23°C ( $\chi^2_1 = 7.5$ ,  $P = 0.007$ ), 25°C ( $\chi^2_1 = 4.7$ ,  $P = 0.031$ ) and 27°C ( $\chi^2_1 = 7.0$ ,  $P = 0.008$ ), with no effect detected at 29°C ( $\chi^2_1 < 0.1$ ,  $P = 0.92$ ) (Fig. 3B). This lengthening of male development was only found at 25°C with the lowest deltamethrin concentration of 0.076 mg/L ( $\chi^2_1 = 13.4$ ,  $P < 0.001$ ;  $P > 0.23$  for other temperatures). Pupal body mass decreased as the developmental temperature increased (Fig. 3C and D). The pupal body mass of females was influenced by temperature ( $F_{3,270} = 32.7$ ,  $P < 0.001$ ) but not by deltamethrin ( $F_{2,268} = 0.8$ ,  $P = 0.44$ ) or the interaction between deltamethrin and temperature ( $F_{6,262} = 0.9$ ,  $P = 0.50$ ). The results were the same in males with an effect from temperature ( $F_{3,279} = 16.4$ ,  $P < 0.001$ ), no significant effect from deltamethrin ( $F_{2,277} = 1.7$ ,  $P = 0.18$ ), and no interaction between deltamethrin and temperature ( $F_{6,271} = 0.3$ ,  $P = 0.94$ ).



**Fig. 3.** Effects of temperature and deltamethrin on developmental time and body mass. **A:** time between the deltamethrin treatment (4<sup>th</sup> larval instar) and adult female emergence, **B:** time between the deltamethrin treatment and adult male emergence, **C:** female pupal body mass, **D:** male pupal body mass. Vertical lines represent the s.e.m. between clutches.

### Reaction norms

Our split-plot experimental design (Fig. 1) allowed us to investigate variation among clutches and variation in the response of clutches to temperature and deltamethrin (reaction norms). Variation among clutches was tested for both clutches reared at 23 and 25°C, and clutches reared at 27 and 29°C. We focused the analyses on our intermediate deltamethrin concentration treatment (0.76 mg/L) compared to the control treatment. Indeed, previous analyses have shown very limited effects of the lowest concentration, and the dramatic larval mortality induced by the highest concentration (Fig. 2) prevented from performing tests on variation among clutches.

First, we compared the statistical models with no clutch variation, total variation among clutches, and variation in the day or week of the collection of the clutches (see Table S3 for the comparison of models). We did not detect variation among clutches in terms of pupal survival and pupal body mass, in either males or females. However, larval survival and developmental time varied among clutches. Larval survival under rearing temperatures of 23 and 25°C appeared to be dependent on the day of collection of the experimental clutches. The day of collection of the clutches also fit the data better than other clutch variations for developmental times of males at 23 and 25°C and of females at 27 and 29°C. The daily variation in the developmental times of females at 23 and 25°C (the second best-fit model) was modelled even more parsimoniously with the week of collection of the clutches. Last, the total clutch variation fit the data of males at 27 and 29°C better than clutch variation limited to temporal fluctuations.

When a variation among clutches was detected (modelled as a variation among clutches, days or weeks), we focused on the variation in the response of the clutches to temperature and deltamethrin treatments. Significant reaction norms were found in most of these tests (Table 1). We detected variation in the response of the clutches to temperature for larval survival, developmental time of females, and developmental time of males. Significant reaction norms to temperature for the developmental time of both sexes were observed at 23 and 25°C, as well as at 27 and 29°C. Variation in the response of the clutches to deltamethrin was detected for larval survival and male developmental time. It is to note that the variation in the response of clutches to the combined effects of temperature and deltamethrin (interactions Temperature x Deltamethrin x Clutch factors) were not significant, even though the interaction Temperature x Deltamethrin x Week of clutch collection was close to be significant for female developmental time at 23 and 25°C ( $\chi^2_3 = 7.7$ ,  $P = 0.052$ ).

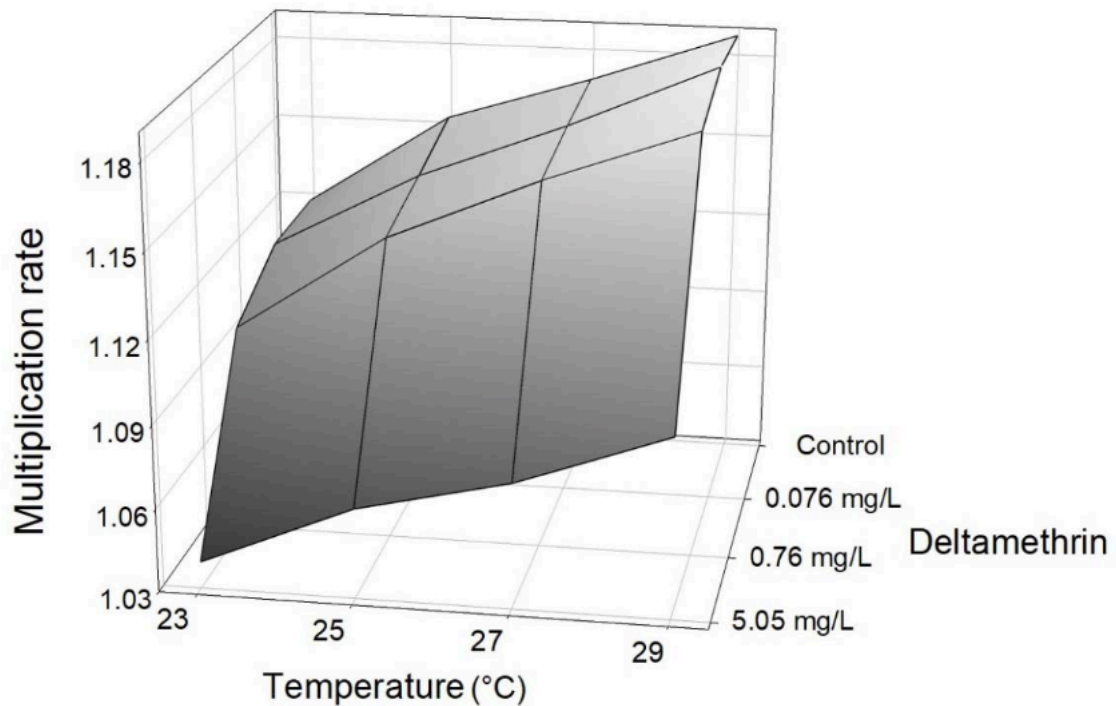
**Table 1.** Reaction norms of the clutches reared at 23 and 25°C or at 27 and 29°C. Table reports the interactions that tested the variation in the response of clutches to temperature and deltamethrin. The clutch factor (Cfactor) considered for each parameter is the one selected in the best-fit models of Table S3. The Cfactor Clutch is the clutch identification numbers that tested total variation among clutches. Day and Week factors tested variation in the day or week of the collection of clutches, respectively.

	Cfactor	Temperature x Cfactor	Deltamethrin x Cfactor
<b>Temperatures of 23 and 25°C</b>			
Larval survival	Day	$X^2_8=39.0 P<0.001$	$X^2_{10}=36.0 P<0.001$
Female developmental time	Week	$X^2_3=27.5 P<0.001$	$X^2_4=8.2 P=0.085$
Male developmental time	Day	$X^2_8=29.2 P<0.001$	$X^2_{10}=32.1 P<0.001$
<b>Temperatures of 27 and 29°C</b>			
Female developmental time	Day	$X^2_{10}=76.1 P<0.001$	$X^2_{11}=15.2 P=0.174$
Male developmental time	Clutch	$X^2_{10}=106.3 P<0.001$	$X^2_{13}=26.9 P=0.013$

### Projection models

We performed simulations with demographic models to integrate the different observed responses among the studied parameters and evaluate their relative importance. We modelled the scenarios crossing the combination of experimental temperatures and deltamethrin treatments (values used to fix the parameters are given in Table S1). Fig. 4 shows the multiplication rate of the 16 simulated scenarios. All the scenarios resulted in a population increase (multiplication rates > 1), even with the worst scenario combining very low larval survival with the highest deltamethrin concentration of 5.05 mg/L (Fig. 2) and slow development at 23°C (Fig. 3). However, the multiplication rates differed greatly among the scenarios from this worst scenario to the most favourable one. The latter was for the control group reared at the highest temperature of 29°C (Fig. 4). Thus, we confirmed our preliminary observations (Fig. S1). Moreover, as expected, deltamethrin decreased the multiplication rates, especially at the highest concentration (Fig. 4). However, we did not find evidence

that the effect of deltamethrin was influenced by temperature, with similar decreases in the multiplication rate between the four experimental temperatures.



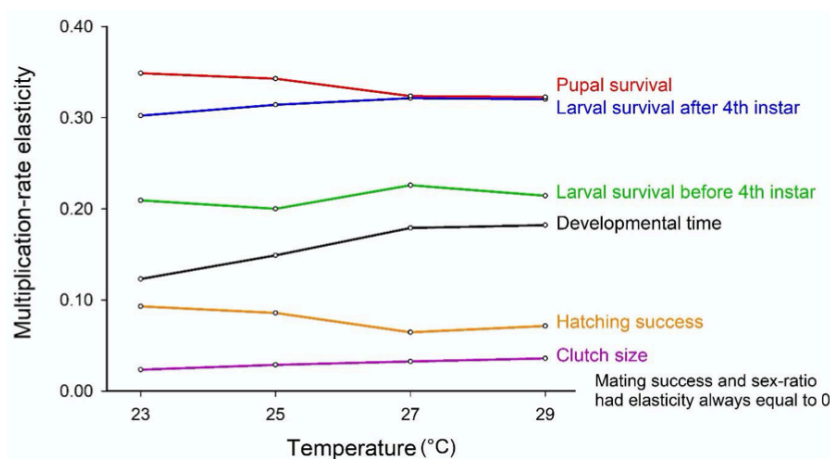
**Fig. 4.** Effects of developmental temperature and deltamethrin on the multiplication rate of simulated populations.

We performed an elasticity analysis to estimate the sensitivity of the multiplication rate to the proportional changes in the vital rates. Based on these relative sensitivities, the elasticity analysis allowed a comparison of the impact of the variation in the different types of parameters (Caswell, 2001; Ferrière et al., 1996). The analysis showed low sensitivities for all the parameters related to reproduction (Fig. 5). The highest sensitivities of the multiplication rate were revealed for pupal survival, late larval survival (after the 4<sup>th</sup> larval instar), early larval survival (before the 4<sup>th</sup> larval instar), and developmental time. In this study, we were able to test the impact of temperature and deltamethrin on three of these four most influential parameters. The frailty of larvae to handling before the 4<sup>th</sup> instar prevented the test on early larval survival.



## DISCUSSION

Temperature and deltamethrin induced additive effects on the population multiplication rate (Fig. 4). The temperature effect was mainly a change in developmental time (Fig. 3), and the deltamethrin effect was mainly an impact on larval mortality (Fig. 2). Developmental time and larval survival were identified as two influential parameters on the population multiplication rate in *S. littoralis* (Fig. 5). For these key parameters, we also revealed significant reaction norms of the clutches for variations of only 2°C, as well as for the response to deltamethrin (Table 1). However, the clutches did not seem to respond differently to the Deltamethrin x Temperature interaction. We found an interaction close to significance only between deltamethrin, temperature and the week of clutch collection for female developmental time. More generally, no clear evidence was obtained for the Deltamethrin x Temperature interaction. A significant Deltamethrin x Temperature interaction was found for the male developmental time, but only small differences caused this interaction. Similarly, we showed only a slight effect in accordance with the result of Riskallah's study (1984), with a significantly decreased toxicity on larval survival between low and high temperatures for the intermediate and lowest concentrations of deltamethrin.



**Fig. 5.** Elasticity of the population multiplication-rate for the vital parameters of *S. littoralis* as a function of developmental temperature. Elasticities (*i.e.*, relative sensitivities of the multiplication rate to the proportional change in the vital rates) were obtained from the models with the estimates obtained in the control groups without deltamethrin.

## Impact of rising temperature

Temperature influences almost all performances in ectotherms such as insects (Angilletta, 2009; Dillon et al., 2009). Accordingly, we showed the influence of temperature on developmental time, larval survival, pupal body mass, multiplication rate, and variation in the reaction norms of clutches. Rising temperatures usually increase the metabolic rate in insects (Deutsch et al., 2018) and consequently accelerate their development as we found (Fig. 3). This is a major concern in terms of the impact of climate warming on pest species because faster development can increase the number of generations per year in species with multiple annual generations (Altermatt, 2010). This is the case in *S. littoralis* which can complete two to seven generations per year (Khafagi et al., 2016). A temperature of 30°C inhibits reproduction and induces high pupal mortality in *S. littoralis* (Sidibé & Laugé, 1977). We revealed here that the thermal optimum was 29°C, with the highest multiplication rate in the control group without deltamethrin (Fig. 4) and with the same observation in our preliminary study (Fig. S1). This result means that the upper thermal limit is very close to the thermal optimum in *S. littoralis*, as observed in other tropical insect species (Deutsch et al., 2008). The thermal optimum at 29°C is mainly due to the dramatic shortening of developmental time at the warmest temperatures (Fig. 3). Indeed, the shortening of the developmental time between 23 and 29°C was 36.1% in females and 36.7% in males. This faster development was detrimental to pupal body mass, which decreased as temperature increased (Fig. 3), as predicted by the temperature-size rule (Atkinson et al., 1996).

It is recommended to study the effects of temperature on developmental plasticity with multiple parameters because the effects often differ between parameters (Mordecai et al., 2019; Sinclair et al., 2016). Here we tested the effects on four parameters, three of them which were the most influential on the multiplication rate of *S. littoralis*: larval survival between the 4<sup>th</sup> instar and pupation, pupal survival and developmental time (Fig. 5). We did not test reproductive parameters that

minimally impact the multiplication rate (Fig. 5) for temperatures below 30°C where reproduction is possible (Sidibé & Laugé, 1977). Regardless of the experimental temperatures and insecticide treatments, the estimated multiplication rates were higher than 1 (Fig. 4). These high multiplication rates can be mainly explained by the high reproductive capacity of this pest species (Malbert-Colas et al., 2020). Indeed, the multiplication rate was higher than 1 even with the dramatic mortality induced by the highest deltamethrin concentration (Fig. 2).

### **Effects of deltamethrin insecticide**

The highest concentration of deltamethrin (5.05 mg/L) induced the mortality of most larvae under the four temperatures tested (Fig. 2), as observed in a previous study at a temperature of 23°C (Malbert-Colas et al., 2020). The intermediate concentration of deltamethrin (0.76 mg/L) induced an intermediate level of larval mortality that was between two previous estimates (31 and 95%) at 23°C (Malbert-Colas et al., 2020). Moreover, this concentration slightly delayed the development of males and females. Pupal survival and body mass were not sensitive to this deltamethrin concentration in either sexes. Interestingly, we found that the response to deltamethrin differed among the clutches in terms of larval survival and developmental time (Table 1). This result illustrates a variation in the sensitivity of clutches to this insecticide. We previously detected another transgenerational effect in *S. littoralis* on sensitivity to the insecticide chlorpyrifos, with a relationship between maternal body mass and offspring sensitivity to chlorpyrifos (Bagni et al., 2020).

Riskallah (1984) showed a Temperature x Deltamethrin interaction in *S. littoralis* for larval survival, with a decrease in deltamethrin toxicity between 20 and 35°C. The toxicity of our intermediate concentration of deltamethrin was also lower at 27 and 29°C than at 23 and 25°C. However, the decrease in deltamethrin toxicity was small in our study. A first explanation of this weak Temperature x Deltamethrin interaction might be the smaller temperature variation we tested. An alternative

explanation might involve the sequence of the deltamethrin and temperature treatments. Riskallah applied deltamethrin to larvae at the 4<sup>th</sup> instar and then exposed larvae to experimental temperatures of 20 and 35°C. Experimental temperatures were applied from the egg stage in our study, and consequently the deltamethrin treatment of larvae (also at the 4<sup>th</sup> instar) was applied later. Effects can differ depending on the sequence of toxicant and temperature treatments as highlighted by the literature on 'toxicant-induced climate susceptibility' and 'climate-induced toxicant sensitivity' (Moe et al., 2013; Noyes & Lema, 2015).

### **Variation among clutches**

The study showed that variation among clutches is a key factor in *S. littoralis*, as found in another moth (Agosta, 2008). Variation among the clutches was detected for larval survival and developmental time, two key parameters in *S. littoralis* (Fig. 5). Analyses of the reaction norms also showed that the clutches responded differently to temperature and deltamethrin. Again, this was detected for larval survival and developmental time (Table 1). Differences of 2°C (between 23 and 25°C or between 27 and 29°C) were sufficient to induce variation in the response of the clutches to temperature. This result suggests a variation in the thermal optimum of the clutches because we studied temperatures close to the thermal optimum of *S. littoralis*. Variation in the response of clutches to deltamethrin indicates variation in their sensitivity to this insecticide.

Variation among clutches observed in our study is not surprising because such family effects with small amount of variation among full siblings are widely expected (Marshall et al., 2010; Moore et al., 2019; Mousseau et al., 2009). They can be genetic or nongenetic effects. Genetic effects are not expected in our laboratory strain and not consistent with rapid temporal fluctuations observed in our rearing (Bagni et al., 2020). Nongenetic transgenerational effects better reflect variation among clutches observed in our studies. These effects involve embryo modifications (energetic

provisioning, hormones, toxins, offspring size, *etc.*) or epigenetic alterations (DNA methylation and histone modification) (Bernardo, 1996b, 1996a; Latzel, 2015). Offspring quality is often influenced by maternal traits and maternal environmental history (Marshall et al., 2010; Moore et al., 2019; Mousseau et al., 2009), notably in insects (Mousseau & Dingle, 1991; Mousseau & Fox, 1998). In *S. littoralis*, we did not have data to test epigenetic alterations (Latzel, 2015; Oppold et al., 2015), but we previously found that maternal body mass influences larval body mass and larval survival (Bagni et al., 2020). We also showed that the mortality caused by the insecticide chlorpyrifos is higher in larvae of larger mothers, providing evidence for transgenerational effects on the sensitivity of *S. littoralis* to insecticides (Bagni et al., 2020).

## Conclusion

Reaction norm analyses are uncommon in ecotoxicology although the parental lineage of experimental individuals can often be known. The benefit of such analyses is illustrated here by the observed reaction norms of clutches to deltamethrin and temperature. Indeed, they revealed that transgenerational effects influence the impact of insecticide and temperature in *S. littoralis*. We are currently working on a similar study with the organophosphorus insecticide chlorpyrifos because results might differ with an insecticide like chlorpyrifos that is expected to be more toxic at an elevated temperature (Hooper et al., 2013). Although no evidence indicated that transgenerational effects influence the Insecticide x Temperature interaction in our study with deltamethrin, we encourage ecotoxicologists to continue to investigate the sensitivity of the Insecticide x Temperature interaction to other factors. In particular, determining the sensitivity of this interaction might be important to assess the future ecological impact of insecticides on non-target species (Dinh et al., 2016; Müller, 2018). It remains crucial to study interactions between different stressors related to anthropogenic environmental effects (Orr et al., 2020) such as climate warming and pesticide use.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Région Ile-de-France (DIM R2DS 2014) to purchase environmental test chambers and by the CNRS (PEPS FaiDoRA).

## REFERENCES

Les références de ce manuscrit ont été intégrées aux références globales de la thèse et sont présentées en page 181.

## APPENDIXES for

**Figure S1** - Estimates of population multiplication-rate

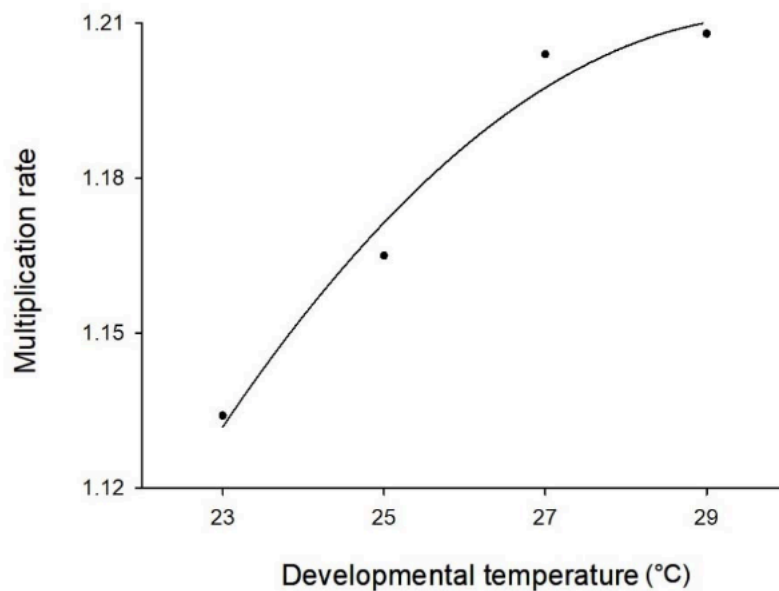
**Table S1** - Values used to fix parameters in matrix models

**Table S2** - Sample sizes

**Figure S2** - Pupal survival rates

**Table S3** - Statistical modelling of variation among clutches

Figure S1: Estimates of population multiplication-rate



**Figure S1.** Population multiplication-rate of our strain of *S. littoralis* as a function of developmental temperature. Estimates were obtained from a preliminary study in spring 2017. Four temperatures (23, 25, 27 and 29°C) were applied from eggs to adult emergence in an experiment without insecticide treatment. We measured early larval survival rate (between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars), late larval survival rate (between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation), pupal survival rate, and developmental times (duration of incubation, between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars, between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, and between pupation and adult emergence). Based on these parameter estimates, we computed the population multiplication rate for each developmental temperature. We performed projection matrix models as described for our other matrix models (see Materials and Methods).

- Duration of incubation was estimated by the survey of 30 clutches divided into two parts, with 15 clutches reared at 23 or 25°C and 15 clutches reared at 27 or 29°C.
- Early larval survival and developmental time between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars were estimated by the survey of experimental boxes with larvae from their 1<sup>st</sup> instar (with an average of 58 larvae per box). We used a factorial design as in the main study (Fig. 1) to cross the factors temperature and clutch, resulting in 13 clutches for 23°C, 11 for 25°C, 14 for 27°C, and 14 for 29°C.
- Other parameters were estimated by the survey of experimental boxes of 40 larvae from their 4<sup>th</sup> instar. At the beginning of the survey, the number of clutches per temperature was of 14 for 23°C, 14 for 25°C, 15 for 27°C, and 15 for 29°C.

## Table S1: Values used to fix parameters in matrix models

**Table S1a.** Estimates of the parameters used in matrix models for the control groups without deltamethrin. For the parameter indicated with \*, we used estimates obtained from the preliminary study of 2017 with the four developmental temperatures. For the reproductive parameters indicated with \*\*, we used estimates obtained from another study (Malbert-Colas et al., 2020) from a control group of adults reared at 23°C (however, Fig. 5 of the present study shows that the influence of reproductive parameters on the multiplication rate of *S. littoralis* is much smaller than the influence of the parameters we estimated under the 4 developmental temperatures).

Developmental temperature	23°C	25°C	27°C	29°C
Duration of incubation period (days) *	4	3	2	2
Duration 1 <sup>st</sup> - 4 <sup>th</sup> instars (days) *	9	7	7	6
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	13	11	10	9
Duration of pupal period (days)	15	12	10	9
Survival from 1 <sup>st</sup> to 4 <sup>th</sup> instars (%) *	68.0	81.1	68.2	63.9
Survival from 4 <sup>th</sup> instar to pupation (%)	73.9	75.6	75.9	77.8
Pupal survival (%)	95.0	92.0	95.9	96.4
Sex-ratio (% of females)	45.9	29.7	46.6	40.7
Adult female survival until laying (%) **	92.8	92.8	92.8	92.8
Laying success after mating (%) **	78.3	78.3	78.3	78.3
Number of eggs laid **	371	371	371	371
Hatching success (%) **	71.3	71.3	71.3	71.3



**Table S1b.** Estimates of the parameters used in matrix models with 0.076 mg/L of deltamethrin. The values for other parameters are reported in Table S2A.

Developmental temperature	23°C	25°C	27°C	29°C
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	13	12	10	9
Duration of pupal period (days)	15	12	10	9
Survival from 4 <sup>th</sup> instar to pupation (%)	73.9	68.3	75.4	81.1
Pupal survival (%)	93.4	94.3	89.1	94.5
Sex-ratio (% of females)	37.8	53.7	42.9	39.0

**Table S1c.** Estimates of the parameters used in matrix models with 0.76 mg/L of deltamethrin. The values for other parameters are reported in Table S2A.

Developmental temperature	23°C	25°C	27°C	29°C
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	14	12	10	9
Duration of pupal period (days)	16	12	10	9
Survival from 4 <sup>th</sup> instar to pupation (%)	51.6	56.1	65.6	64.4
Pupal survival (%)	96.4	94.1	91.3	95.7
Sex-ratio (% of females)	52.9	44.6	50.8	46.1

**Table S1d.** Estimates of the parameters used in matrix models with 5.05 mg/L of deltamethrin. The values for other parameters are reported in Table S2A.

Developmental temperature	23°C	25°C	27°C	29°C
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	15	12	11	10
Duration of pupal period (days)	17	13	11	9
Survival from 4 <sup>th</sup> instar to pupation (%)	4.2	5.0	6.7	8.3
Pupal survival (%)	83.3	88.9	91.7	100.0
Sex-ratio (% of females)	42.9	44.4	66.7	46.7

## Table S2: Sample sizes

**Table S2a.** Sample sizes per temperature for the control groups without deltamethrin

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival	165	180	195	180
Female pupal survival	55	54	69	57
Male pupal survival	66	82	79	83
Female developmental time	53	51	66	54
Male developmental time	62	75	76	81
Female pupal body mass	22	22	26	24
Male pupal body mass	22	24	26	24

**Table S2b.** Sample sizes per temperature for the groups with 0.076 mg/L of deltamethrin

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival	165	180	195	180
Female pupal survival	45	66	63	57
Male pupal survival	79	56	84	88
Female developmental time	42	63	57	53
Male developmental time	71	53	74	85
Female pupal body mass	22	23	24	24
Male pupal body mass	22	24	26	24

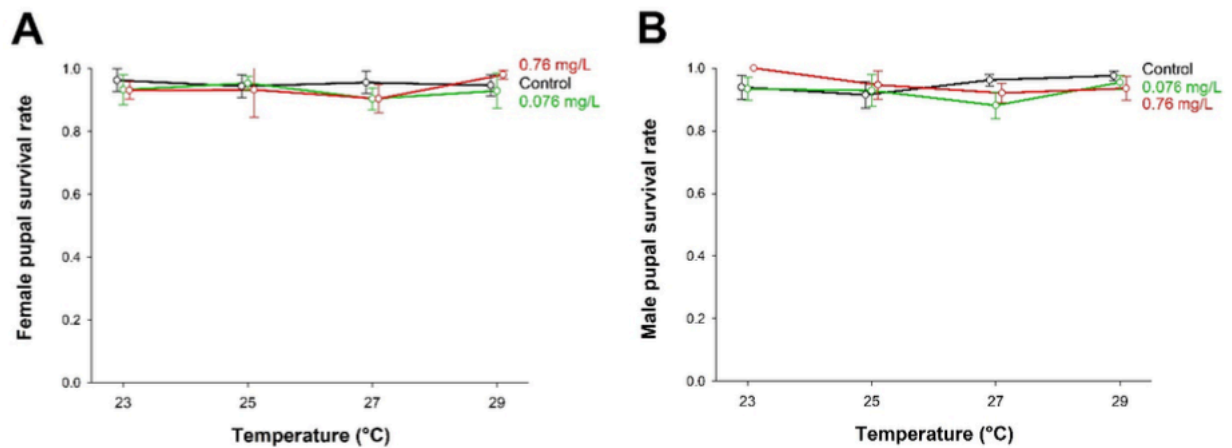
**Table S2c.** Sample sizes per temperature for the groups with 0.76 mg/L of deltamethrin

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival	165	180	195	180
Female pupal survival	44	45	63	53
Male pupal survival	40	56	63	62
Female developmental time	41	42	57	52
Male developmental time	39	53	58	58
Female pupal body mass	20	22	21	24
Male pupal body mass	20	23	24	24

**Table S2d.** Sample sizes per temperature for the groups with 5.05 mg/L of deltamethrin

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival	165	180	195	180
Female pupal survival	3	4	8	7
Male pupal survival	3	5	4	8
Female developmental time	3	4	7	7
Male developmental time	2	4	4	8
Female pupal body mass	3	4	6	7
Male pupal body mass	4	5	3	7

**Figure S2: Pupal survival rates**



**Figure S2.** Effects of temperature and deltamethrin on pupal survival rates. **A:** female pupal survival, and **B:** male pupal survival. Vertical lines represent the s.e.m. between clutches.

**Table S3: Statistical modelling of variation among clutches**

**Table S3.** Tests of the variation among clutches reared at 23 and 25°C or at 27 and 29°C. Statistical modelling was performed with no clutch variation (M0 models), total variation among clutches (Clutch), and variation in the day or week of the collection of clutches (Day, Week). All models included temperature, deltamethrin treatments, Temperature x Deltamethrin interaction, and all interactions with the clutch factor tested. The table reports AICc, *i.e.*, Akaike Information Criterion corrected for small sample size (White & Burnham, 1999). The lower the AICc value is, the more appropriate the model is to fit the data. The best fitted models with the lowest AICc values are reported in bold. Logistic analyses were used for all parameters, except for pupal body mass analysed with generalized linear models.

	M <sub>0</sub>	Clutch	Day	Week
<b>Temperatures of 23 and 25°C</b>				
Larval survival	873.0	839.3	<b>833.2</b>	854.9
Female pupal survival	<b>92.5</b>	187.6	162.2	107.7
Male pupal survival	<b>109.6</b>	190.8	169.3	132.3
Female developmental time	237.4	242.1	226.4	<b>205.0</b>
Male developmental time	296.9	250.7	<b>245.4</b>	279.0
Female pupal body mass	- <b>236.1</b>	- 201.4	- 203.4	- 204.1
Male pupal body mass	- <b>338.8</b>	- 294.0	- 297.6	- 300.3
<b>Temperatures of 27 and 29°C</b>				
Larval survival	<b>899.4</b>	931.7	915.3	901.9
Female pupal survival	<b>105.9</b>	206.6	183.0	129.0
Male pupal survival	<b>117.1</b>	209.2	186.4	133.2
Female developmental time	308.1	301.2	<b>291.5</b>	307.4
Male developmental time	348.9	<b>283.5</b>	287.9	313.2
Female pupal body mass	- <b>317.5</b>	- 287.2	- 291.5	- 284.4
Male pupal body mass	- <b>336.4</b>	- 292.4	- 293.2	- 292.6

## B. Effets de la température sur la sensibilité au chlorpyriphos

Dans cette étude, j'ai étudié l'impact combiné de la température, de l'insecticide chlorpyriphos et de leur interaction sur des paramètres clés du cycle de vie de *S. littoralis*. J'ai adopté la méthodologie de la précédente étude sur la deltaméthrine afin de disposer d'une étude tout à fait comparable pour juger au mieux les éventuelles différences de résultats. C'était particulièrement intéressant du fait que la toxicité des deux insecticides était prédite pour être modifiée de manière opposée avec l'augmentation de la température. En tant qu'organophosphoré, le chlorpyriphos est prédit pour avoir une toxicité accrue avec des températures plus élevées (Lydy et al. 1999; Meng et al. 2020; Tran et al. 2018). J'ai réalisé l'étude sur les mêmes quatre températures proches de l'optimum thermique de *S. littoralis* (23, 25, 27 et 29°C) et pour deux concentrations de chlorpyriphos (31 et 44 mg/L, traitements qui ont été comparés à un traitement contrôle). Comme pour l'étude précédente, mes objectifs étaient de tester une gamme de températures plus resserrée qu'habituellement autour de l'optimum, de considérer les effets sur de multiples paramètres du cycle de vie, ainsi que d'étudier la possible influence d'effets transgénérationnels sur les effets de la température, du chlorpyriphos et de leur interaction.

Cette étude visait à éventuellement conforter un résultat de l'étude de Tran et al. (2018) qui montrait une influence d'effets transgénérationnels sur l'interaction entre la température et le chlorpyriphos chez le moustique *Culex pipiens*. Cet impact croisé entre température, insecticide et effets transgénérationnels n'avait en effet pas été observé dans une étude de Meng et al. (2022), ni dans mon expérimentation précédente sur la deltaméthrine.

Cette partie repose sur un article intitulé « The impact of temperature on insecticide sensitivity depends on transgenerational effects » publié en août 2022 dans le journal **Science of the Total Environment**.

## The impact of temperature on insecticide sensitivity depends on transgenerational effects

Thibaut Bagni, David Siauxsat, Annick Maria, Philippe Couzi, Martine Maibèche, and Manuel Massot

Sorbonne Université, CNRS, INRAe, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, iEES-Paris, F-75005, Paris, France

**ABSTRACT.** The combined effects of insecticides and temperature are increasingly being studied because species are expected to change their responses to insecticides with climate warming. As recently highlighted, the impact of temperature on insecticide sensitivity might be influenced by the environment experienced by the previous generation. However, a pioneering study that showed this transgenerational effect in the mosquito *Culex pipiens* needs to be confirmed because two other studies did not show similar results. Here, we performed an experiment on the moth *Spodoptera littoralis* to test this hypothesis. We analysed reaction norms among experimental families to test transgenerational effects, *i.e.*, the variation in the response of families to the combined effects of the insecticide chlorpyrifos and developmental temperature. Reaction norm analyses revealed that the responses of the families to chlorpyrifos and temperature differed for developmental time and larval survival, two key parameters in *S. littoralis*. Crucially, for larval survival, a family effect influenced the impact of temperature on chlorpyrifos sensitivity. This finding confirms the pioneering study on *C. pipiens* that showed transgenerational effects on the combined effects of insecticides and temperature. This result also highlights that transgenerational plasticity can be important to consider in ecotoxicology.

**Keywords:** Pesticide, climate warming, transgenerational plasticity, reaction norm, mortality, development.

## 1. INTRODUCTION

Ecotoxicologists are increasingly concerned about the combined effects of insecticides and temperature on species (Massot et al., 2021; Meng et al., 2022a, 2022b, 2020; Noyes and Lema, 2015). The focus on this interaction between temperature and insecticides has occurred for two reasons. First, greater insecticide use as a result of the current climate change is likely because the impact of warming on insect pests is predicted to augment crop production losses (Deutsch et al., 2018). Second, temperature can influence species responses to insecticides in multiple ways: (i) the uptake and excretion of insecticides are often positively related to temperature (Hooper et al., 2013; Noyes et al., 2009), particularly in ectotherms such as insects (Hooper et al., 2013); (ii) temperature can alter the biotransformation of insecticides, with a change in their toxicity (Hooper et al., 2013; Noyes et al., 2009); (iii) the activity of detoxification enzymes likely depends on temperature as in other enzymes (Angilletta, 2009; Kingsolver, 2009); and (iv) species resistance to insecticides might evolve with climate warming (Fournier-Level et al., 2016).

As recently highlighted, the interaction between temperature and insecticides might depend on the environmental effects experienced by the previous generation (Tran et al., 2018). In the mosquito *Culex pipiens*, the effect of warming on mortality caused by the insecticide chlorpyrifos disappeared in the offspring of parents that suffered from warming and the insecticide (Tran et al., 2018). However, this parental effect on the interaction between temperature and insecticides was not found in two other studies (Massot et al., 2021; Meng et al., 2022a). The environmental effects experienced by the previous generation are defined as transgenerational plasticity (Salinas and Munch, 2012; Shama et al., 2014). Transgenerational plasticity describes a variation in offspring plasticity among parents that experienced different environments (Shama et al., 2014). Transgenerational plasticity can be inferred from studies testing the same environmental factors on offspring and parental generations (e.g., Tran et al., 2018) or from studies testing different environmental factors

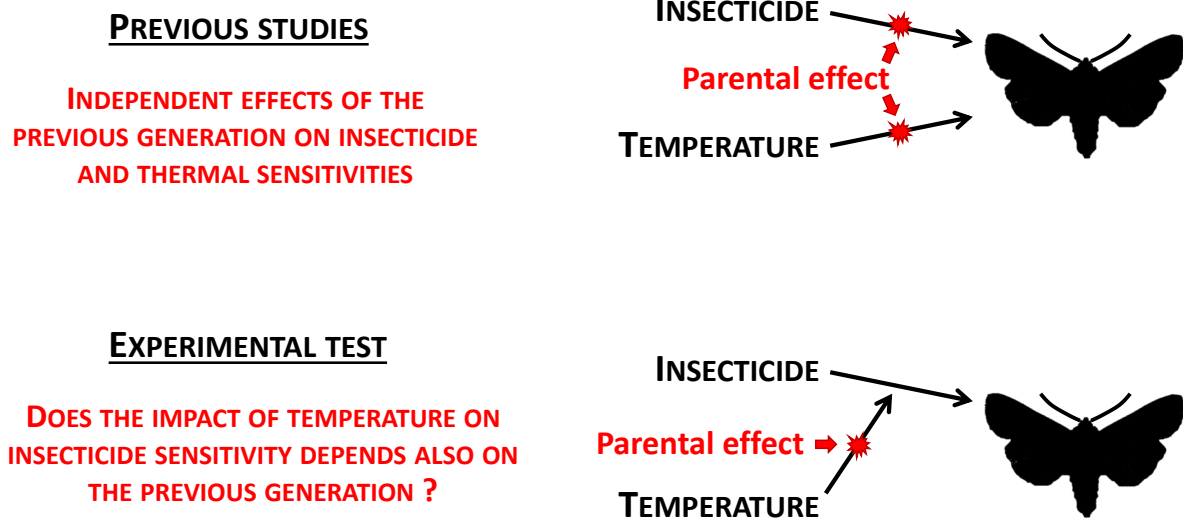
between the two generations (*e.g.*, Bashey, 2006). Here, we aimed to test the influence of transgenerational plasticity on the interaction between temperature and insecticide in *Spodoptera littoralis*, a model insect for which we have already shown other transgenerational effects (Bagni et al., 2020; Massot et al., 2021).

In one study, we showed transgenerational plasticity on the sensitivity of *S. littoralis* to the insecticide chlorpyrifos, namely, an effect of maternal size. The toxicity of chlorpyrifos was higher in the offspring of larger mothers (Bagni et al., 2020). In a second study, we showed transgenerational plasticity on insecticide and thermal sensitivities of *S. littoralis*, namely, variation in larval survival and developmental time among families for their response to temperature and the insecticide deltamethrin (Massot et al., 2021). This study illustrated the benefit of performing reaction norm analyses to test the variation in the responses of families to toxicants, an approach advised for use more in ecotoxicology (Massot et al., 2021). In the current study, we tested the hypothesis of transgenerational plasticity on the impact of temperature on insecticide sensitivity (Fig. 1). This experiment is based on reaction norm analyses among experimental families as in Massot et al. (2021), but it tested the insecticide chlorpyrifos rather than deltamethrin. We expected different results because the pyrethroid insecticide deltamethrin is less toxic at elevated temperatures (Riskallah, 1984), while the organophosphorus insecticide chlorpyrifos is more toxic at elevated temperatures (Lydy et al., 1999; Meng et al., 2020; Tran et al., 2018). In particular, higher temperatures enhance the biotransformation of chlorpyrifos to more toxic metabolites (Lydy et al., 1999). Although chlorpyrifos was recently banned in some countries, its use is still very common worldwide (Rahman et al., 2021). Its use is also common against *S. littoralis* (Dewer et al., 2016), this species being a major crop pest (CABI, 2020).

The study is based on a split-plot design crossing chlorpyrifos and temperature treatments. Temperatures of 23, 25, 27 and 29 °C were applied during all development stages. We tested experimental effects on larval survival, pupal survival,



development duration, and pupal body mass. Projection models based on life cycle modelling were also used to estimate the effects on the population growth rate. Reproductive parameters were not studied because they minimally impact the population growth rate of *S. littoralis* at temperatures between 23 and 29 °C (Massot et al., 2021). Key analyses of the study were tests of the variation in the response of experimental families for the temperature-induced increase in chlorpyrifos toxicity, *i.e.*, the analyses that questioned transgenerational plasticity of the interaction between temperature and insecticide.



**Fig. 1.** Conceptual framework of the study. Previous studies (top scenario) showed transgenerational plasticity on insecticide and thermal sensitivities of *S. littoralis* (Bagni et al., 2020; Massot et al., 2021). Our experimental study (bottom scenario) aims to test transgenerational plasticity on the impact of temperature on insecticide sensitivity.

## 2. MATERIALS AND METHODS

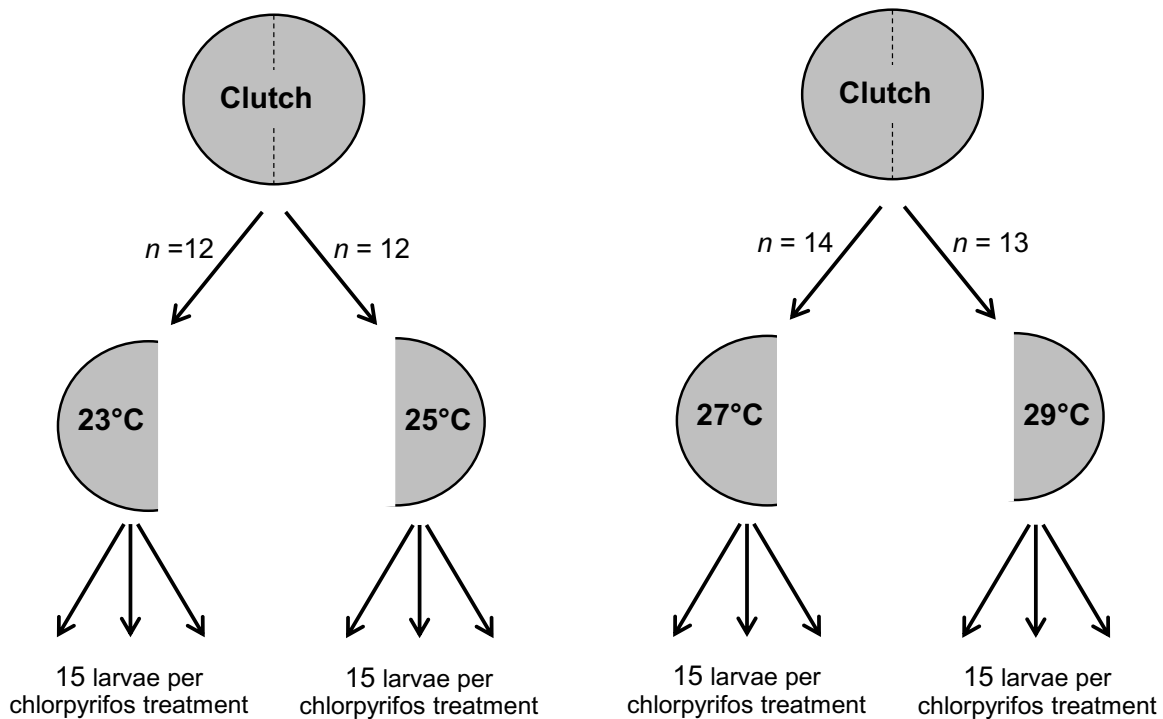
### 2.1. Experimental design

We performed the study on a laboratory strain maintained at 23 °C and 60-70 % relative humidity, with a 16:8 light/dark cycle, and using a semiartificial food (Hinks and Byers, 1976). We produced experimental clutches following the methodology

detailed in Massot et al. (2021). We collected clutches from 19<sup>th</sup> March to 11<sup>th</sup> April 2018. This short period was chosen to discard the possibility that a genetic evolution in our rearing leads to effects of the date of collection of the clutches. Therefore, we expected effects of the date of clutch collection related only to transgenerational plasticity as found in Massot et al. (2021). We used a split-plot design to test the response of clutches to temperature and chlorpyrifos (*i.e.*, reaction norms). Clutches collected were divided into two parts to rear them at 23 or 25 °C, and at 27 or 29 °C (Fig. 2). We chose these close temperatures from 23 to 29 °C because our previous study on deltamethrin insecticide showed that differences of 2 °C within this thermal range were sufficient to induce variation in the response of families to temperature in *S. littoralis* (Massot et al., 2021). We also chose these temperatures because they are near the thermal optimum of *S. littoralis*, and responses to temperature are better estimated near the thermal optima of species (Johnson et al., 2015). The thermal optimum of *S. littoralis* was previously estimated at 29 °C (Massot et al., 2021). We used environmental test chambers (Panasonic MLR-352H, France) to control temperatures independently of relative humidity, maintained at 70 %.

We applied the chlorpyrifos treatments when experimental larvae were at the 4<sup>th</sup> instar. Each of the half-clutches was divided into three treatment groups of fifteen larvae (Fig. 2). The test solutions with chlorpyrifos (45395, Sigma Pestanal, France) were prepared by serial dilutions in ethanol and hexane. We used hexane because chlorpyrifos has a low solubility in ethanol. The treatment solutions with chlorpyrifos were compared to a control solution of 10 % ethanol and 90 % hexane (ratio with the highest quantity of ethanol used in our chlorpyrifos solutions). The control solution had no toxicity or a very low toxicity in the studied species (Massot et al., 2021). The treatment solutions had chlorpyrifos concentrations of 31 and 44 mg/L. The chlorpyrifos concentration of 44 mg/L is close to the LC<sub>50</sub> defined in a previous study, with a larval mortality of 58% (Bagni et al., 2020). We applied 0.5 µL of the treatment solutions to the head of the larvae (Hamilton 25 µL syringe with Hamilton dispenser). Mortality was checked 48 hours after the treatment, at pupation, and at adult

emergence. Our survey was performed on 2295 larvae reared in 153 experimental boxes. At pupation, we identified the sex of surviving larvae and we weighed two males and two females per experimental box. Developmental time was measured by the duration between the chlorpyrifos treatment and adult emergence.



**Fig. 2.** Split-plot experimental design. Clutches were divided to rear them under two temperatures. These half-clutches were divided into three insecticide groups (two chlorpyrifos concentrations and one control solution) when larvae were at the 4<sup>th</sup> instar. The rearing temperature of larvae was the same before and after the insecticide treatment. The influence of transgenerational effects on the combined effects of temperature and chlorpyrifos was tested from the variation in the responses of clutches.

## 2.2. Data analyses

Table S1 in Appendix A provides the sample sizes per temperature and chlorpyrifos treatment for each of the tested parameters: larval survival 48 h posttreatment, larval survival > 3 days posttreatment, pupal survival, developmental time and pupal body mass. Following the approach detailed in Massot et al. (2021), all parameters were analysed in two steps. First, we tested the responses to temperature, chlorpyrifos, and

their interaction. Second, we analysed the reaction norms of the clutches to temperature and chlorpyrifos. Reaction norm analyses were based on a comparison of statistical models with no clutch variation, total variation among clutches, and variation in the date of clutch collection. Total variation among clutches was modelled with our identification number of clutches. Variation in the date was modelled with the day or week of collection of clutches (clutches were collected at 11 days of three weeks). Models were compared with Akaike information criterion (White and Burnham, 1999). When we found a variation among clutches, the variation in the responses of the clutches to temperature and chlorpyrifos was examined with the tests on the interactions Temperature x Clutch, Chlorpyrifos x Clutch, and Temperature x Chlorpyrifos x Clutch.

We used logistic models to analyse the binomial variables (larval survival 48 h posttreatment, larval survival > 3 days posttreatment, and pupal survival). For developmental time and pupal body mass, we performed an analysis of variance in our test of temperature and chlorpyrifos effects. Reaction norms were tested with generalized linear models to include random factors (clutch and date factors) in mixed-effects linear models. Residuals of the models were examined for normality and homogeneity of variances. We had to perform logistic models for developmental time because these conditions were not met (even using logarithmic transformation). We discretized developmental time with regard to the median values of each temperature treatment to maintain variation in analyses. Indeed, the overlapping between the developmental times of temperature treatments was very limited. The 99 % confidence interval of the developmental time was 27.9-28.4 days at 23 °C ( $n = 349$ ), 22.3-22.7 days at 25 °C ( $n = 391$ ), 19.4-19.7 days at 27 °C ( $n = 421$ ), and 17.9-18.2 days at 29 °C ( $n = 328$ ). We carried out statistical analyses with JMP software (JMP Pro 15, SAS Institute Inc., Cary, NC), and we simplified models by stepwise removal of terms with  $P > 0.10$ .

### 2.3. Life cycle modelling

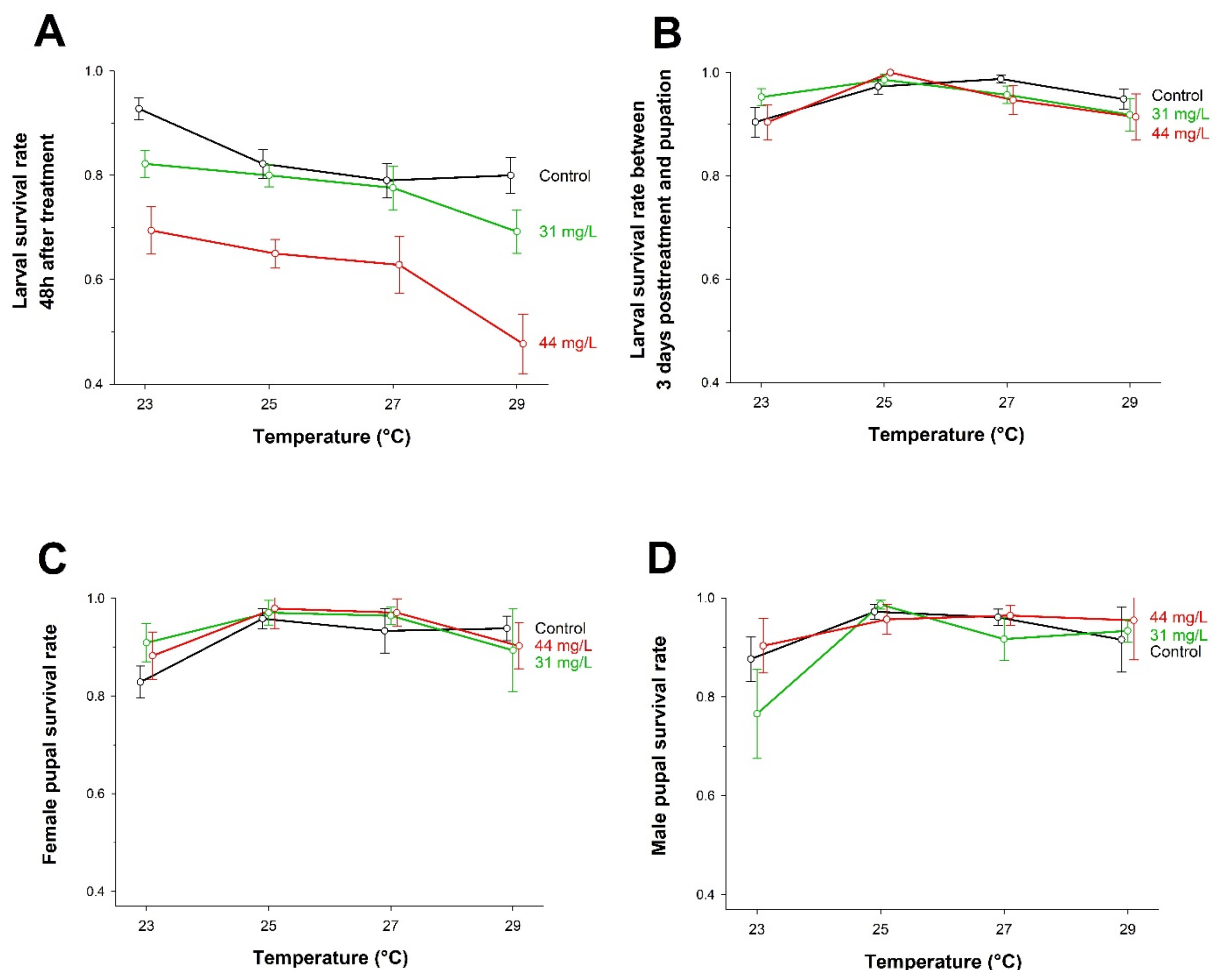
We followed the methodology detailed in Massot et al. (2021) to estimate the multiplication rate at the population level (Caswell, 2001). In summary, the life cycle of *S. littoralis* was modelled with an age-structured matrix where each age class was one day, and the asymptotic population growth rate was estimated by the dominant eigenvalue of the matrix. This matrix model was parameterised with the estimates obtained in the study for larval survival 48 h posttreatment, larval survival > 3 days posttreatment, pupal survival, duration between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, duration of pupal period, and sex-ratio. Other parameters were fixed with estimates obtained in previous studies (Malbert-Colas et al., 2020; Massot et al., 2021). Table S2 provides the values used in the models. The modelling was conducted using the program ULM (Legendre and Clobert, 1995).

## 3. RESULTS

### 3.1. Effects of temperature and chlorpyrifos

We first investigated the influence of temperature and chlorpyrifos on larval survival between the chlorpyrifos treatment (at the 4<sup>th</sup> larval instar) and pupation. Larval survival rates were decreased by chlorpyrifos 48 hours after treatment (Fig. 3A) for both experimental concentrations ( $\chi^2_1 = 11.2$ ,  $P = 0.001$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_1 = 99.3$ ,  $P < 0.001$  for 44 mg/L *versus* the control group). If this chlorpyrifos effect did not significantly differ between temperatures for the concentration of 31 mg/L ( $\chi^2_3 = 6.6$ ,  $P = 0.086$  for Chlorpyrifos x Temperature interaction), then it was stronger at 29 °C for the concentration of 44 mg/L (Fig. 3A,  $\chi^2_3 = 8.7$ ,  $P = 0.033$  for Chlorpyrifos x Temperature interaction). We also observed an overall effect of temperature, with larval survival rates decreasing with the warmest temperatures ( $\chi^2_3 = 39.2$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 3A).

For the larval survival rates estimated between the third day after the chlorpyrifos treatment and pupation (Fig. 3B), we detected a marginally significant Chlorpyrifos x Temperature interaction in our comparison between the concentration of 31 mg/L and the control group ( $\chi^2_1 = 7.6$ ,  $P = 0.056$ ) and a significant Chlorpyrifos x Temperature interaction in our comparison between the concentration of 44 mg/L and the control group ( $\chi^2_1 = 9.3$ ,  $P = 0.026$ ). When compared to those of the control group, the larval survival rates of the chlorpyrifos treatments tended to be lower at the highest temperatures (Fig. 3B). However, this response was small compared to the quick response after the first 48 hours (comparison with Fig. 3A).

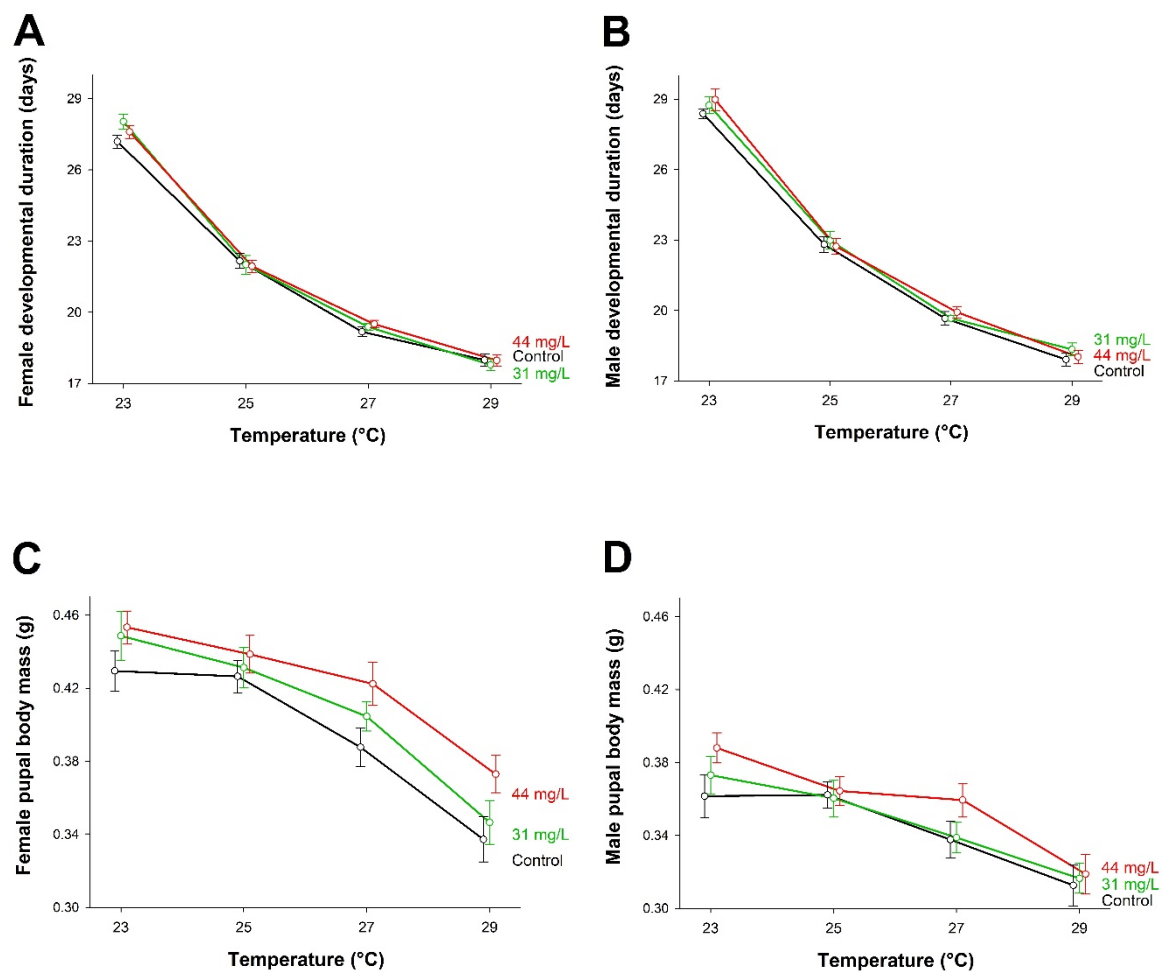


**Fig. 3.** Variation in survival between temperature and chlorpyrifos treatments. A: Larval survival rate 48 h after the chlorpyrifos treatment, B: larval survival rate between the 3rd day after the chlorpyrifos treatment and pupation, C: female pupal survival rate, D: male pupal survival rate. Error bars are s.e.m. between clutches.

The chlorpyrifos treatments did not affect female pupal survival ( $\chi^2_1 = 1.2$ ,  $P = 0.28$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_1 = 0.8$ ,  $P = 0.38$  for 44 mg/L *versus* the control group) and male pupal survival ( $\chi^2_1 = 1.9$ ,  $P = 0.16$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_1 = 0.3$ ,  $P = 0.56$  for 44 mg/L *versus* the control group). Moreover, the Chlorpyrifos x Temperature interaction was not significant in females ( $\chi^2_3 = 2.5$ ,  $P = 0.47$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_3 = 1.8$ ,  $P = 0.62$  for 44 mg/L *versus* the control group) or males ( $\chi^2_3 = 3.2$ ,  $P = 0.37$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_3 = 0.9$ ,  $P = 0.83$  for 44 mg/L *versus* the control group). Pupal survival rates responded only to temperature, in females ( $\chi^2_3 = 10.7$ ,  $P = 0.014$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_3 = 12.9$ ,  $P = 0.005$  for 44 mg/L *versus* the control group) and males ( $\chi^2_3 = 24.1$ ,  $P < 0.001$  for 31 mg/L *versus* the control group;  $\chi^2_3 = 9.0$ ,  $P = 0.030$  for 44 mg/L *versus* the control group). Overall, pupal survival rates were smaller at the lowest developmental temperature of 23 °C (Fig. 3C and D).

A dramatic shortening of development was observed at the warmest temperatures in females and males (Fig. 4A and B). The 99 % confidence intervals of the developmental time did not overlap between the four studied temperatures (see values in Materials and Methods). When compared to the control group, the chlorpyrifos treatments did not affect the developmental time of females ( $\chi^2_1 = 0.2$ ,  $P = 0.69$  for 31 mg/L;  $\chi^2_1 < 0.1$ ,  $P = 0.85$  for 44 mg/L) or the developmental time of males at the chlorpyrifos concentration of 44 mg/L ( $\chi^2_1 = 2.6$ ,  $P = 0.11$ ). The developmental time of males differed significantly between the chlorpyrifos concentration of 31 mg/L and the control group ( $\chi^2_1 = 5.4$ ,  $P = 0.021$  for 31 mg/L), but this difference corresponded only to a very slight lengthening of their development with chlorpyrifos (Fig. 4B). Moreover, the developmental time of males did not significantly differ between the chlorpyrifos concentrations of 31 and 44 mg/L ( $\chi^2_1 = 0.3$ ,  $P = 0.56$ ). The Chlorpyrifos x Temperature interaction was not significant in females ( $\chi^2_3 = 6.0$ ,  $P = 0.11$  for 31 mg/L;  $\chi^2_3 = 4.1$ ,  $P = 0.25$  for 44 mg/L) or males ( $\chi^2_3 = 1.2$ ,  $P = 0.75$  for 31 mg/L;  $\chi^2_3 = 4.7$ ,  $P = 0.19$  for 44 mg/L). Males had a slower development than females, except at the highest temperature (Wilcoxon tests:

$P < 0.001$  at 23, 25 and 27°C,  $P = 0.198$  at 29°C).



**Fig. 4.** Variation in developmental time and body mass between temperature and chlorpyrifos treatments. A: Time between the chlorpyrifos treatment (4<sup>th</sup> larval instar) and adult female emergence, B: time between the chlorpyrifos treatment and adult male emergence, C: female pupal body mass, D: male pupal body mass. Error bars are s.e.m. between clutches.

Figure 4 shows an overall decrease in pupal body mass at elevated temperatures in females ( $F_{3,194} = 41.4$ ,  $P < 0.001$  for 31 mg/L;  $F_{3,190} = 31.9$ ,  $P < 0.001$  for 44 mg/L) and males ( $F_{3,199} = 17.2$ ,  $P < 0.001$  for 31 mg/L;  $F_{3,192} = 18.6$ ,  $P < 0.001$  for 44 mg/L). When compared to the control group, the chlorpyrifos treatment with the highest concentration of 44 mg/L led to a higher body mass of females ( $F_{1,190} = 15.4$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 4C) and males ( $F_{1,192} = 5.9$ ,  $P = 0.016$ ; Fig. 4D). The lowest chlorpyrifos concentration of 31 mg/L did not induce a significant increase in body mass in females ( $F_{1,194} = 3.5$ ,  $P = 0.062$ ) or males ( $F_{1,198} = 0.4$ ,  $P = 0.54$ ). The



Chlorpyrifos x Temperature interaction was not significant in females ( $F_{3,191} = 0.2$ ,  $P = 0.87$  for 31 mg/L;  $F_{3,187} = 0.7$ ,  $P = 0.58$  for 44 mg/L) or males ( $F_{3,195} = 0.2$ ,  $P = 0.87$  for 31 mg/L;  $F_{3,189} = 1.0$ ,  $P = 0.40$  for 44 mg/L).

### 3.2. Reaction norm analyses

We studied the variation among clutches and in the response of clutches to temperature and chlorpyrifos (reaction norms) as allowed by our split-plot experimental design (Fig. 2). Variation among clutches was tested for clutches reared at 23 or 25 °C, and clutches reared at 27 or 29 °C. We first compared statistical models with no clutch variation, total variation among clutches (modelled with the identification number of clutches), and variation in the day or week of the collection of clutches (see Table S3 for the comparison of models). We found that developmental time varied among clutches for males and females, and for the two thermal ranges. The week of collection of clutches better fit the data than other clutch variations for developmental times under rearing temperatures of 23 and 25 °C. The day of collection of clutches better fit the data for developmental times under temperatures of 27 and 29 °C. Under rearing temperatures of 27 and 29 °C, larval survival 48 hours after chlorpyrifos treatment was also dependent on the date of collection of experimental clutches (with equivalent models for the date modelled as the day or week). For all these cases where a variation among clutches was found, we tested the variation in the response of clutches to temperature and chlorpyrifos. These reaction norms were significant for larval survival and developmental time under temperatures of 27 and 29 °C (Table 1). The interaction Temperature x Chlorpyrifos x Date of clutch collection (modelled as the day or week) was significant for larval survival 48 h posttreatment. Variation in the response of clutches to temperature was detected for the developmental time of males and females, and variation in the response of clutches to chlorpyrifos was detected for the developmental time of females.

**Table 1.** Response of clutches to temperature and chlorpyrifos. The clutch factor ( $C_{\text{factor}}$ ) tested for each variable is the one that better fit the data (see Table S3). The  $C_{\text{factor}}$  Day or Week tested variation in the day or week of the collection of clutches, respectively. Significant effects are reported in bold.

	$C_{\text{factor}}$	Temperature x Chlorpyrifos x $C_{\text{factor}}$	Temperature x $C_{\text{factor}}$	Chlorpyrifos x $C_{\text{factor}}$
<b>Temperatures of 23 and 25 °C</b>				
Female developmental time	Week	$X^2_2=1.3$ $P=0.524$	$X^2_1=0.8$ $P=0.381$	$X^2_4=1.7$ $P=0.793$
Male developmental time	Week	$X^2_2=1.3$ $P=0.528$	$X^2_1=1.5$ $P=0.225$	$X^2_4=8.2$ $P=0.084$
<b>Temperatures of 27 and 29 °C</b>				
Larval survival 48 h posttreatment	Day	$X^2_{10}=\mathbf{23.0}$ $P=\mathbf{0.011}$	$X^2_5=9.4$ $P=0.094$	$X^2_{10}=16.1$ $P=0.098$
Larval survival 48 h posttreatment	Week	$X^2_4=\mathbf{9.7}$ $P=\mathbf{0.047}$	$X^2_2=5.8$ $P=0.054$	$X^2_4=\mathbf{10.3}$ $P=\mathbf{0.035}$
Female developmental time	Day	$X^2_9=11.8$ $P=0.223$	$X^2_5=\mathbf{34.2}$ $P<\mathbf{0.001}$	$X^2_{10}=\mathbf{30.0}$ $P<\mathbf{0.001}$
Male developmental time	Day	$X^2_{10}=9.0$ $P=0.532$	$X^2_5=\mathbf{51.6}$ $P<\mathbf{0.001}$	$X^2_{10}=15.8$ $P=0.107$

### 3.3. Projection models

The responses of the studied parameters were integrated into demographic models. We simulated the twelve scenarios that combined experimental temperatures and chlorpyrifos treatments (see Table S2 for the values used to fix parameters). Overall, the multiplication rate of the simulated populations increases as the temperature increases (Fig. 5). This response is particularly strong between 23 and 25 °C. Chlorpyrifos decreases the multiplication rate as expected, particularly at the highest concentration of 44 mg/L. The strongest decrease in the multiplication rate with a concentration of 44 mg/L occurs at 29 °C, which highlights the impact of the significant Chlorpyrifos x Temperature interaction on the larval survival rates 48 hours after the chlorpyrifos treatment (Fig. 3A).

## 4. DISCUSSION

The main aim of the study was to test the influence of transgenerational plasticity on the impact of temperature on insecticide sensitivity (Fig. 1). The analyses of reaction

norms showed variation in the response of clutches to temperature and chlorpyrifos. These significant reaction norms of the clutches were revealed for larval survival and developmental time (Table 1). Larval survival and developmental time are critical parameters, particularly in *S. littoralis*, in which they strongly influence the population multiplication rate (Massot et al., 2021). The key result of the study is the significant interaction between chlorpyrifos, temperature and the date of clutch collection for larval survival, indicating that the offspring response to the interaction between insecticide and temperature differed among experimental families, showing transgenerational plasticity for the impact of temperature on chlorpyrifos toxicity. Before discussing this main finding, the overall effects of temperature and chlorpyrifos are discussed.

#### **4.1. Effects of temperature and chlorpyrifos**

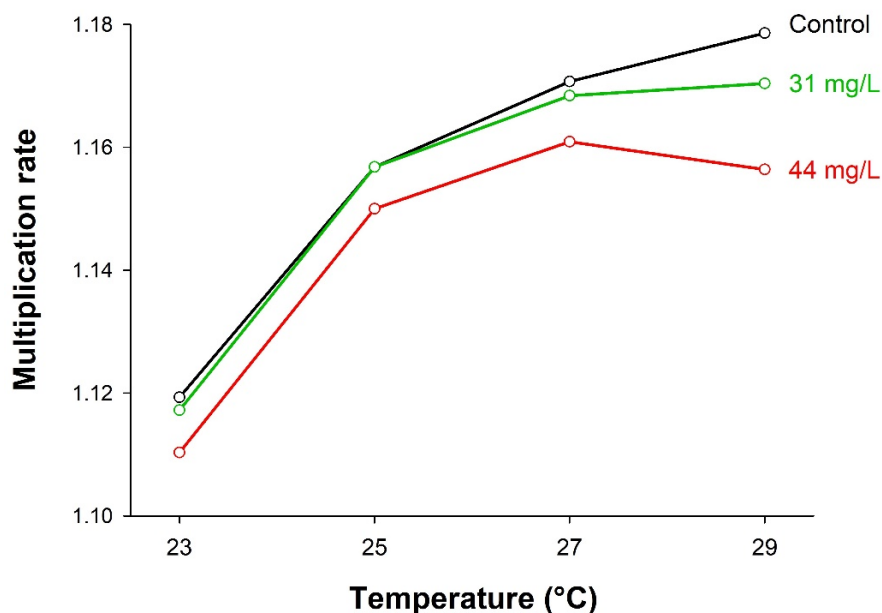
As advised in studies on the thermal biology of species in the context of climate change, we tested the influence of temperature on multiple parameters, considered responses to small temperature variations to take into account the non-linearity of most thermal responses, tested interactive effects, and controlled for transgenerational effects (Mordecai et al., 2019; Sinclair et al., 2016). We found that the increase in temperature decreased larval survival 48 hours after the chlorpyrifos treatment (Fig. 3A), increased pupal survival rates of females and males (Fig. 3C and D), strongly reduced developmental time of females and males (Fig. 4A and B), and decreased pupal body mass of females and males (Fig. 4C and D). These various responses to temperature were expected because the characteristics of ectotherms are almost all sensitive to temperature (Angilletta, 2009). Interestingly, we observed here that small variations of only 2° C were sufficient to induce noticeable responses. In particular, a variation between 27 and 29° C was sufficient to lead to significant reaction norms of the clutches (significant interactions with the temperature factor in Table 1). Moreover, we found a dramatic shortening of developmental time between 23 and 25 °C (Fig.

4A and B). This strong response can be explained by the positive effect of temperature on the metabolic rate of insects (Deutsch et al., 2018). For *S. littoralis*, which can complete two to seven generations per year (Khafagi et al., 2016), the dramatic shortening of developmental time with a small temperature variation is an important threat because it will likely increase the number of generations per year for this pest in the context of climate change (Altermatt, 2010).

Another interesting finding is the varying responses among the studied parameters. The warmest temperatures were beneficial for pupal survival and developmental time but detrimental for larval survival 48 hours after the chlorpyrifos treatment and pupal body mass. These opposite responses show the importance of studying the effects of temperature on multiple parameters (Mordecai et al., 2019; Sinclair et al., 2016) and specifically show that the thermal optimum differs among parameters in *S. littoralis*. Moreover, the upper thermal limit of this species is close to 30°C: *S. littoralis* cannot reproduce at a temperature of 30 °C, and this temperature also causes low pupal survival (Sidibé and Laugé, 1977). The latter response is in contrast to the high pupal survival rates observed at 29 °C (Fig. 3C and D, and Massot et al., 2021). The temperature of 29 °C also led to the highest multiplication rate in the control group without chlorpyrifos (Fig. 5), as also observed in a previous study (Massot et al., 2021). Thus, the thermal optimum in *S. littoralis* is very close to its upper thermal limit. The dramatic shortening of developmental time at the highest temperatures is the main reason for the thermal optimum at 29 °C (Fig. 4A and B): the developmental time between 23 and 29 °C was shortened by 35.2 % in females and 36.9 % in males, values very close to previous estimates (36.1 % in females and 36.7 % in males) obtained in Massot et al. (2021). The faster development of *S. littoralis* at the highest temperatures was detrimental to pupal body mass (Fig. 4C and D) as in many ectotherms (Atkinson, 1996).

Larval survival 48 hours after treatment was decreased by the two experimental concentrations of chlorpyrifos (Fig. 3A). Chlorpyrifos also tended to decrease larval

survival between 3 days posttreatment and pupation at the highest temperatures (Fig. 3B). The pupal survival and developmental time of females and males were not sensitive to chlorpyrifos, except maybe for a slight lengthening of male development. However, the highest chlorpyrifos concentration of 44 mg/L increased pupal body mass in both sexes (Fig. 4C and D). As an organophosphorus insecticide, chlorpyrifos is expected to be more toxic at elevated temperatures (Lydy et al., 1999; Meng et al., 2020; Tran et al., 2018), except when elevated temperatures induce a faster insecticide degradation (Meng et al. 2022b). This synergistic interaction between chlorpyrifos and temperature can be caused by changes in metabolism, the activity of detoxification enzymes, and/or biotransformation processes (Hooper et al., 2013; Noyes et al., 2009). In our study, chlorpyrifos and temperature acted synergistically on larval survival 48 hours after treatment with a significant Chlorpyrifos x Temperature interaction at a concentration of 44 mg/L. Indeed, chlorpyrifos toxicity was stronger at 29 °C (Fig. 3A), as also illustrated by its impact on the population multiplication rate (Fig. 5).



**Fig. 5.** The multiplication rate of simulated populations as a function of temperature and chlorpyrifos.

## 4.2. Transgenerational plasticity for the impact of temperature on chlorpyrifos toxicity

The environmental effects experienced by the previous generation might influence the interaction between insecticides and temperature. This scenario was shown in one study on the mosquito *Culex pipiens* with the loss of the effect of temperature on mortality caused by chlorpyrifos in the offspring of parents that suffered from warming and chlorpyrifos (Tran et al., 2018). However, other studies did not find such a transgenerational effect on the interaction between insecticides and temperature (Massot et al., 2021; Meng et al., 2022a). Our reaction norm analyses tested whether the impact of temperature on chlorpyrifos toxicity depended on transgenerational effects. Transgenerational effects were inferred from the variation in the responses of clutches as in Massot et al. (2021). In particular, we tested the responses of clutches in function of their date of collection (Day and Week effects of the Tables 1 and S3). Indeed, the date of the collection of clutches was previously shown to parsimoniously describe the variation in the responses of clutches (Massot et al., 2021). The experiment was performed on clutches collected during a short period (from 19<sup>th</sup> March to 11<sup>th</sup> April 2018) to discard the possibility that the variation in the responses of clutches among dates was caused by a genetic evolution in our laboratory rearing.

Variation in the responses of clutches among dates was found for larval survival and developmental time (Table S3), and analyses of the reaction norms revealed that the clutches responded differently to temperature and chlorpyrifos (Table 1). This variation among clutches in *S. littoralis* was also detected in a study that tested the impact of temperature on the toxicity of another insecticide, the pyrethroid insecticide deltamethrin (Massot et al., 2021). The significant reaction norms to chlorpyrifos (significant interactions with the chlorpyrifos factor in Table 1) shows that the sensitivity of larvae to chlorpyrifos differed among the clutches. The finding of this transgenerational plasticity reinforces the results of a previous study that showed a relationship between maternal body mass and offspring sensitivity to chlorpyrifos in *S. littoralis* (Bagni et al., 2020). The significant reaction norms to

temperature (significant interactions with the temperature factor in Table 1) suggest also a variation in the thermal optimum of the clutches.

The variation among our experimental clutches might reflect a transgenerational plasticity induced by epigenetic changes (DNA methylation, histone change). Unfortunately, our data did not allow to investigate epigenetic factors (Brevik et al., 2018; Latzel, 2015). Alternatively, variation among clutches might have been embryo changes (energy storage, size, hormones,...) (Bernardo, 1996; Latzel, 2015). Maternal environment or characteristics often induce such changes (Moore et al., 2019). These maternal effects are the main component of transgenerational plasticity (Salinas and Munch, 2012; Shama et al., 2014) and are well documented in insects (Mousseau and Dingle, 1991). In *S. littoralis*, we previously showed a relationship between maternal body mass and the sensitivity to the insecticide chlorpyrifos. The mortality caused by chlorpyrifos was higher in larvae of larger mothers (Bagni et al., 2020).

### 4.3. Conclusions

The key result of our study is the significant interaction between chlorpyrifos, temperature and clutches for larval survival (Table 1). This result shows that the offspring response to the interaction between insecticide and temperature differed among families, and consequently provides evidence of transgenerational plasticity for the impact of temperature on chlorpyrifos toxicity. Because two studies did not show the influence of transgenerational effects on the interaction between insecticide and temperature (Massot et al., 2021; Meng et al., 2022a), this result is an important confirmation of the pioneering study of Tran et al. (2018), who also showed the sensitivity of the interaction between insecticide and temperature to transgenerational effects. Furthermore, our results illustrate that transgenerational effects can be important to consider in ecotoxicology, as highlighted by other recent studies (Brevik et al., 2018; Massot et al., 2021; Meng et al., 2022a). Transgenerational effects are important to consider as a lagged source of individual heterogeneity

(Benton et al., 2006) and their study could benefit the management of pest species and risk assessment procedures on non-target species (Müller, 2018).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We acknowledge funding from the Région Ile-de-France (*Réseau de Recherche sur le Développement Soutenable*, DIM R2DS 2014) and the CNRS (*Centre National de la Recherche Scientifique*, PEPS FaiDoRA).

## **REFERENCES**

Les références de ce manuscrit ont été intégrées aux références globales de la thèse et sont présentées en page 181.

## **APPENDIXES**

**Table S1** - Sample sizes

**Table S2** - Values used to fix parameters in matrix models

**Table S3** - Statistical modelling of variation among clutches



**Table S1a.** Sample sizes per temperature for control groups without chlorpyrifos.

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival 48 h posttreatment	180	180	210	195
Larval survival > 3days posttreatment	167	148	164	156
Female pupal survival	70	72	60	65
Male pupal survival	81	72	102	83
Female developmental time	58	69	56	61
Male developmental time	71	70	98	76
Female pupal body mass	24	24	26	25
Male pupal body mass	24	24	28	26

**Table S1b.** Sample sizes per temperature for groups with 31 mg/L of chlorpyrifos.

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival 48 h posttreatment	180	180	210	195
Larval survival > 3days posttreatment	148	144	163	135
Female pupal survival	77	68	84	47
Male pupal survival	64	74	72	75
Female developmental time	70	66	81	42
Male developmental time	49	73	66	70
Female pupal body mass	24	24	28	24
Male pupal body mass	24	24	28	25

**Table S1c.** Sample sizes per temperature for groups with 44 mg/L of chlorpyrifos.

	23°C	25°C	27°C	29°C
Larval survival 48 h posttreatment	180	180	210	195
Larval survival > 3days posttreatment	125	117	132	93
Female pupal survival	51	48	68	41
Male pupal survival	62	69	56	44
Female developmental time	45	47	66	37
Male developmental time	56	66	54	42
Female pupal body mass	24	24	26	22
Male pupal body mass	23	24	25	23

**Table S2: Values used to fix parameters in matrix models**

**Table S2a.** Estimates of the parameters used in matrix models for control groups without chlorpyrifos. For the parameters indicated with \*, estimates were obtained in a previous study (Massot et al., 2021) that used the four developmental temperatures. For the reproductive parameters indicated with \*\*, we used estimates obtained in another study (Malbert-Colas et al., 2020) from a control group of adults reared under 23 °C (however, the influence of reproductive parameters on the multiplication rate of *S. littoralis* is much smaller than the influence of the parameters we estimated under the four developmental temperatures - Massot et al., 2021).

<b>Developmental temperature</b>	<b>23°C</b>	<b>25°C</b>	<b>27°C</b>	<b>29°C</b>
Duration of incubation period (days) *	4	3	2	2
Duration 1 <sup>st</sup> - 4 <sup>th</sup> instars (days) *	9	8	7	7
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	13	11	11	9
Duration of pupal period (days)	15	11	9	9
Survival from 1 <sup>st</sup> to 4 <sup>th</sup> instars (%) *	68.0	81.1	68.2	63.9
Larval survival 48 h posttreatment (%)	92.8	82.2	79.0	80.0
Larval survival > 3days posttreatment (%)	90.4	97.3	98.8	94.9
Pupal survival (%)	85.4	96.5	95.1	92.6
Sex-ratio (% of females)	46.4	50.0	37.0	43.9
Adult female survival until laying (%) **	92.8	92.8	92.8	92.8
Laying success after mating (%) **	78.3	78.3	78.3	78.3
Number of eggs laid **	371	371	371	371
Hatching success (%) **	71.3	71.3	71.3	71.3

**Table S2b.** Estimates of the parameters used in matrix models with 31 mg/L of chlorpyrifos. The values for other parameters are reported in Table S2a.

<b>Developmental temperature</b>	<b>23°C</b>	<b>25°C</b>	<b>27°C</b>	<b>29°C</b>
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	13	11	11	9
Duration of pupal period (days)	15	11	9	9
Larval survival 48 h posttreatment (%)	82.2	80.0	77.6	69.2
Larval survival > 3days posttreatment (%)	95.3	98.6	95.7	91.9
Pupal survival (%)	84.4	97.9	94.2	90.3
Sex-ratio (% of females)	54.6	47.9	53.8	38.5

**Table S2c.** Estimates of the parameters used in matrix models with 44 mg/L of chlorpyrifos. The values for other parameters are reported in Table S2a.

<b>Developmental temperature</b>	<b>23°C</b>	<b>25°C</b>	<b>27°C</b>	<b>29°C</b>
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	14	11	11	10
Duration of pupal period (days)	15	11	9	8
Larval survival 48 h posttreatment (%)	69.4	65.0	62.9	47.7
Larval survival > 3days posttreatment (%)	90.4	100.0	94.7	91.4
Pupal survival (%)	89.4	96.6	96.0	92.9
Sex-ratio (% of females)	45.1	41.0	54.8	48.2

**Table S3: Statistical modelling of variation among clutches**

**Table S3.** Tests of the variation among clutches reared at 23 and 25 °C, or at 27 and 29 °C. Statistical modelling was performed with no clutch variation ( $M_0$  models), total variation among clutches (Clutch), and variation in the day or week of the collection of clutches (Day, Week). All models included temperature, chlorpyrifos treatments, Temperature x Chlorpyrifos interaction, and all interactions with the clutch factor tested. Table reports AICc, *i.e.*, Akaike Information Criterion corrected for small sample size (White & Burnham, 1999). The lower the AICc value is, the more appropriate the model to fit the data. The lowest AICc values, comparable with values that do not differ by more than two, are reported in bold. Logistic analyses were used for all parameters, except for pupal body mass analysed with generalized linear models.

	Models			
	$M_0$	Clutch	Day	Week
<b>Temperatures of 23 and 25 °C</b>				
Larval survival 48 h posttreatment	<b>1077.2</b>	1245.2	1167.1	1092.6
Larval survival > 3days posttreatment	<b>310.9</b>	491.7	406.4	331.5
Female pupal survival	<b>212.9</b>	466.7	308.1	227.1
Male pupal survival	<b>235.4</b>	462.9	318.3	248.2
Female developmental time	402.3	542.4	441.8	<b>393.8</b>
Male developmental time	539.6	647.2	554.4	<b>536.5</b>
Female pupal body mass	<b>-447.9</b>	-393.0	-393.7	-389.3
Male pupal body mass	<b>-506.8</b>	-452.6	-449.9	-445.4
<b>Temperatures of 27 and 29 °C</b>				
Larval survival 48 h posttreatment	1433.9	1455.8	<b>1419.3</b>	<b>1419.2</b>
Larval survival > 3days posttreatment	<b>340.1</b>	432.4	367.5	352.4
Female pupal survival	<b>173.7</b>	330.3	198.2	180.7
Male pupal survival	<b>205.5</b>	329.3	230.5	207.8
Female developmental time	468.9	489.5	<b>393.4</b>	431.9
Male developmental time	566.1	504.2	<b>454.4</b>	518.4
Female pupal body mass	<b>-490.9</b>	-439.9	-430.1	-430.5
Male pupal body mass	<b>-543.1</b>	-498.4	-498.0	-491.5

## C. Synthèse

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux effets de la température sur la sensibilité à deux insecticides chez *S. littoralis*. C'est une thématique importante dans le contexte du réchauffement climatique où il est prédit de plus grands dégâts des ravageurs de cultures (Deutsch et al., 2018), avec pour conséquence probable un accroissement d'utilisation d'insecticides. La combinaison de ces trois perturbations environnementales globales est d'autant plus à craindre qu'elle est complexe de par le couplage des interactions entre température et ravageurs (Deutsch et al., 2018) avec les interactions entre température et insecticides (Hooper et al., 2013), sans oublier les interactions entre ravageurs et insecticides (évolution de résistance, effets hormétiques). Dans ce contexte, les connaissances acquises dans les études du type de celles de ce chapitre sont importantes.

La principale conclusion de ce chapitre est que l'on peut avoir l'interaction la plus complexe entre température, ravageur et insecticide comme cela a été montré par l'étude sur le chlorpyrifos, et que cette interaction est d'autant plus complexe qu'elle recouvre des effets différés au travers d'effets transgénérationnels. Ce résultat a constitué une importante confirmation de l'interaction similaire montrée par Tran et al. (2018).

Deux points méthodologiques assez instructifs ont aussi émergé des études de ce chapitre. Le premier est d'avoir montré l'intérêt de réaliser des analyses sur des normes de réactions inter-familiales dans des tests écotoxicologiques, une approche statistique largement ignorée en écotoxicologie. Le second enseignement méthodologique a été que de petites variations de 2°C ont suffi à provoquer des réponses importantes, que soit pour des différences de vitesse de développement ou pour mettre en évidence des effets transgénérationnels.

Pour finir, l'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre ont souligné l'intérêt pour les études d'écotoxicologie de prendre davantage en compte les effets

transgénérationnels et de poursuivre l'approfondissement des connaissances sur les interactions entre la température et les insecticides.

## Chapitre V. Etude de régimes thermiques fluctuants

Ce chapitre s'intéresse aux effets de la fluctuation journalière de la température. Une grande partie des études de biologie thermique étaient et restent très majoritairement réalisées avec des températures constantes. Ce choix méthodologique pourrait amener à ce que les effets observés ne soient pas représentatifs des situations en milieu naturel. En effet, les organismes font face à une fluctuation de la température souvent importante dans la majeure partie des écosystèmes terrestres et aquatiques. Cette fluctuation thermique s'exprime à différentes échelles temporelles (variations entre les heures, journées, mois, saisons, années). La fluctuation journalière de la température à l'échelle des heures, avec notamment la variation jour/nuit, est loin d'être négligeable. Les fluctuations proches de 10°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$  autour de la moyenne journalière) sont les valeurs les plus communément observées (Wang & Dillon 2014). Dans la dernière décennie, les études comparant les effets de régimes thermiques fluctuants et constants sont devenues un tout petit peu plus courantes. Ceci est illustré dans une revue de littérature sur les insectes qui est présentée dans le manuscrit du chapitre V<sub>A</sub> (Table S1). Dans leur majorité, les études ont montré des différences d'effet de la température selon son régime fluctuant ou constant. Au-delà des effets directs de la fluctuation de la température sur les organismes, son impact peut passer par la modification des effets d'autres facteurs. Ceci est abordé dans ce chapitre en considérant l'impact des températures fluctuantes sur la sensibilité aux insecticides. Le facteur insecticide est évidemment important pour un ravageur comme *S. littoralis*, et ce d'autant plus en regard des interactions montrées entre température et insecticides au chapitre IV pour des régimes thermiques constants.

## A. Comparaison de régimes thermiques constants et fluctuants

Cette étude visait à comparer des régimes thermiques journaliers fluctuants et constants sur le cycle de développement complet de *S. littoralis*, incluant des mesures de reproduction des adultes. Les effets de la fluctuation journalière des températures, ainsi que des différences entre températures moyennes, ont été testés sur neuf composantes de la valeur sélective de l'espèce. Cette approche sur de multiples paramètres est recommandée car les paramètres peuvent réagir différemment à la température (Mordecai et al. 2019; Sinclair et al. 2016). L'expérimentation a été réalisée sur des températures fluctuantes de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  autour des températures moyennes, et ces dernières ont été choisies assez élevées (25, 29 and  $33^{\circ}\text{C}$ ) afin de centrer l'étude sur des variations thermiques entre la température optimale et la température proche de la limite supérieure supportée par *S. littoralis*. En effet, c'est dans cette zone que les réponses des paramètres sont prédites les plus importantes du fait de la proximité entre température optimale et limite supérieure tolérée par les espèces (Colinet et al. 2015; Martin & Huey 2008; Paaijmans et al. 2013; Stoks et al. 2017). Ceci est d'autant plus important que les insectes seront plus souvent confrontés à des réponses critiques pour des températures élevées dans le contexte du réchauffement climatique (Kearney et al., 2009).

Une de nos hypothèses était que la valeur sélective avec une fluctuation journalière de la température devrait être inférieure à celle avec une température constante, mais avec une différence davantage marquée pour une température élevée proche de la limite supérieure supportée par l'espèce. Les températures élevées seraient en effet particulièrement déterminantes dans les différences entre régimes fluctuants et constants (Ma et al. 2015). L'étude a été enrichie par une revue de la littérature sur la comparaison de régimes thermiques fluctuants et constants chez les insectes (Table S1 du manuscrit). Le manuscrit présenté ci-après va être soumis prochainement.



# The fitness responses to high temperatures are underestimated when daily thermal fluctuation is ignored

Thibaut Bagni, David Siaussat, Annick Maria, Annabelle Fuentes, Philippe Couzi, and Manuel Massot

Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), Sorbonne Université, CNRS, INRAE, IRD, Université Paris Créteil, Université Paris cité, F-75005, Paris, France

## ABSTRACT

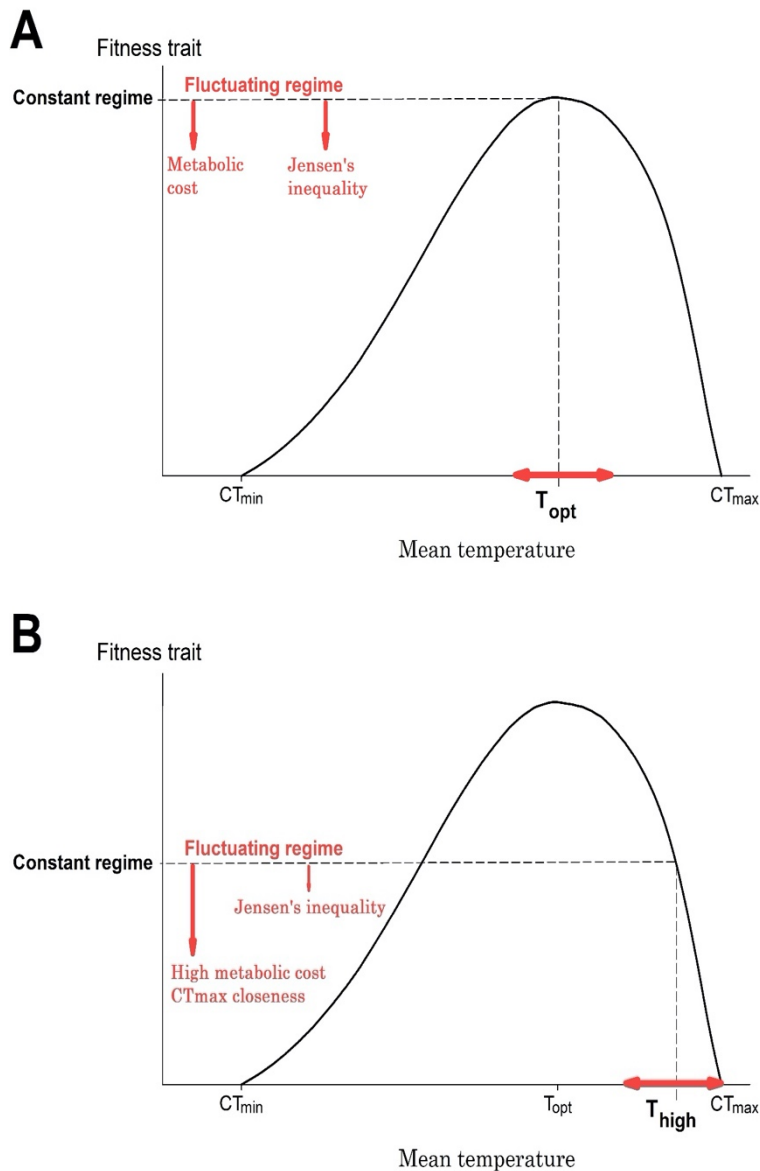
Researches on thermal biology of organisms are become a priority to investigate the impact of climate warming. However, most experimental studies are carried out under constant temperatures and assumes a negligible effect of daily fluctuating temperatures. We tested this assumption on multiple fitness traits of the moth *Spodoptera littoralis*, and a literature review in insects complemented this study. Tests on *S. littoralis* were focused on its optimal and maximal critical temperatures by comparing constant and daily fluctuating temperatures ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) at mean temperatures of 25, 29 and 33°C. The nine fitness parameters investigated were influenced by mean temperature. The overall effect was a maximal multiplication rate at 29°C and a marked decrease under the fluctuating regime at 33°C. In particular, developmental and larval survival rates at 33°C were lower under the fluctuating thermal regime than at constant temperature. Our literature review supports also that ignore daily fluctuations using constant temperatures leads very commonly to overestimate fitness traits at high temperatures. Overlook this experimental bias will minimise the expected impact of climate warming on fitness traits.

**KEYWORDS:** fluctuating temperature, Jensen's inequality, metabolic cost, CTmax, insects

## 1. INTRODUCTION

Most organisms face variation in temperature during their lifetime because temperature varies between hours of the day, days, months, seasons, and years in most environments. Thermal variation can be particularly high over the hours of the day compared to other temporal scales (Sheldon & Dillon, 2016). Notwithstanding this well-known reality, most laboratory studies (on thermal biology or not) are carried out with daily constant temperatures. It is therefore crucial to check the assumption of the studies that results do not differ between constant and daily fluctuating temperatures (*e.g.*, Colinet et al., 2015; Ma et al., 2015; Stoks et al., 2017) and to investigate the causes that might falsify this assumption. Our study focussed on fitness traits. We tested the assumption of no difference between constant and daily fluctuating temperatures on multiple fitness traits of the model insect *Spodoptera littoralis* and made a literature review in insects (Table S1).

In ectotherms like insects, the response to temperature of most traits are nonlinear and asymmetric, and declines quickly at temperatures above the optimum (Colinet et al., 2015; Martin & Huey, 2008; Paaijmans et al., 2013; Stoks et al., 2017). The thermal performance curve (TPC) of fitness traits can be characterised by three tipping points: the optimal temperature ( $T_{opt}$ ) where fitness is maximal and two critical temperatures where fitness is nil (minimal and maximal temperatures, respectively  $CT_{min}$  and  $CT_{max}$ ) as illustrated in Figure 1. The difference between constant and daily fluctuating temperatures should depend on the mean temperature studied (*e.g.*, close to  $T_{opt}$ ,  $CT_{min}$  or  $CT_{max}$ ) (Colinet et al., 2015; Stoks et al., 2017) as well as on the breadth of variation in fluctuating temperatures (Colinet et al., 2015; Stoks et al., 2017). The combination of the mean temperature and breadth of variation can be summarised by the range of fluctuating temperatures investigated.



**FIGURE 1** Expected responses of fitness traits to constant and fluctuating thermal regimes. Based on a theoretical thermal performance curve (TPC) under the constant regime, the expected deviations of the fluctuating regime are indicated by the red arrows associated with the fitness axis. The double red arrow on the temperature axis indicates an example of range of fluctuating temperatures. TPC is characterised by the optimal temperature  $T_{opt}$  where fitness value is the highest and by critical temperatures  $CT_{min}$  and  $CT_{max}$  where fitness value is nil. **A:** Predictions for temperatures close to  $T_{opt}$ , **B:** predictions for high temperatures ( $T_{high}$ ). Although the fluctuating regime is predicted to be more detrimental than the constant regime in the two scenarios, we expect this negative effect to be higher in the  $T_{high}$  than  $T_{opt}$  scenario because of a higher metabolic cost and  $CT_{max}$  closeness. This difference might be partly counterbalanced by a lower effect of Jensen's inequality in the  $T_{high}$  than  $T_{opt}$  scenario (the magnitude of this effect is positively related to the degree of curvature of the TPC under the range of fluctuating temperatures)

In our study on *S. littoralis*, we focused on ranges around  $T_{opt}$  and  $CT_{max}$  by comparing constant and daily fluctuating temperatures at relatively high temperatures (mean temperatures of 25, 29 and 33°C, with a daily variation of 5°C around each mean temperature). Indeed, insects will be more frequently challenged by high temperatures with climate warming (Kearney et al., 2009). Moreover, the responses of traits are predicted to be particularly sensitive to high temperatures because  $T_{opt}$  and  $CT_{max}$  are close in typical TPCs of ectotherms (Colinet et al., 2015; Martin & Huey, 2008; Paaijmans et al., 2013; Stoks et al., 2017). We previously showed that  $T_{opt}$  and  $CT_{max}$  are close in *S. littoralis* studied under constant temperatures (Bagni et al., 2022; Massot et al., 2021).

Figure 1 illustrates our predictions for the responses of fitness traits under thermal ranges close to  $T_{opt}$  (Figure 1A) and  $CT_{max}$  (Figure 1B). Under these thermal ranges, the difference between constant and fluctuating temperatures can have different causes. As a first cause, the nonlinear TPCs lead to unbalanced effects between temperatures that fluctuate below and beyond a mean temperature (Ruel & Ayres, 1999). The overall response of a trait can be predicted from the form of nonlinear functions by a mathematical property known as Jensen's inequality (Ruel & Ayres, 1999). By definition, the function around  $T_{opt}$  (where fitness is maximal) is a decelerating function (the convex part of the TPC in Figure 1). The prediction for a decelerating function is that the response of traits will be worse under fluctuating temperatures than constant temperatures (Colinet et al., 2015; Ruel & Ayres, 1999; Stoks et al., 2017). A second cause of differential response between fluctuating and constant temperatures is related to metabolism. The energetic cost of metabolism in ectotherms is important in the thermal range of high temperatures because the metabolic rate tends to increase exponentially as temperature increases (Colinet et al., 2015; Ruel & Ayres, 1999). This accelerating function between metabolism and temperature leads to another effect of Jensen's inequality with metabolic cost higher under fluctuating than constant temperature. We discuss the effect of metabolic cost independently of Jensen's inequality because metabolism is not a fitness trait, but it

may influence fitness traits. A third cause of differential response between fluctuating and constant temperatures is related to the influence of the critical temperature  $CT_{max}$  (Ma et al., 2015). Temperatures close to  $CT_{max}$  are known to result in detrimental effects related to heat stress. Although heat stress induces the synthesis of heat shock proteins (HSPs) that allow organisms to cope stronger and longer heat stress, even the production of HSPs have negative effects (Colinet et al., 2015; Feder & Hofmann, 1999). These negative effects can be associated with energetic cost, consumption of nutrients, toxicity at high HSPs concentration, and detrimental interaction with cellular processes (Feder & Hofmann, 1999).

We expect additive effects of the three causes of difference between constant and fluctuating temperatures (Jensen's inequality, metabolic cost,  $CT_{max}$  closeness) because they involve different processes that are not mutually exclusive, and Figure 1 synthesises our predictions. We predict lower fitness values under fluctuating than constant temperatures, both for thermal ranges close to  $T_{opt}$  and  $CT_{max}$  (respectively, the  $T_{opt}$  and  $T_{high}$  scenarios in Figure 1). However, a larger difference in the  $T_{high}$  scenario is expected because of a higher metabolic cost and  $CT_{max}$  closeness. The difference of metabolic cost between fluctuating and constant should be higher under the  $T_{high}$  than  $T_{opt}$  scenario because metabolism increases exponentially as temperature increases (Colinet et al., 2015; Ruel & Ayres, 1999). A weaker effect of Jensen's inequality in the  $T_{high}$  scenario might partly counterbalance these metabolic and  $CT_{max}$  effects because the effect of Jensen's inequality should be stronger around  $T_{opt}$  where the degree of curvature of the TPC is higher. Figure 1 does not report the case of a thermal range including fluctuating temperatures beyond  $CT_{max}$ . The prediction for this extreme scenario is simply that fluctuating temperatures will result in the largest decrease of fitness compared to constant temperatures (Stoks et al., 2017) or even a nil fitness. In summary, we expect lower fitness values in fluctuating thermal regime compared to constant regime at optimal and high temperatures but with a clearer difference at higher temperatures.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Study species

Mediterranean moth species were sensitive to climate warming during the last two decades as indicated by a negative relationship between species richness and temperature (Uhl et al., 2022). The moth *S. littoralis* is a widespread Mediterranean and African pest that damages many plants of economic importance (CABI, 2020). This species is well-known, easy to rear in laboratory, with facilities to estimate fitness traits, and several studies provided key knowledges on its thermal biology. Under constant temperatures, the thermal optimum of the population multiplication rate of *S. littoralis* was previously estimated at 29 °C (Bagni et al., 2022; Massot et al., 2021). However, the response to constant temperatures differed among studied parameters and shows the importance of studying the effects of temperature on multiple parameters (Mordecai et al., 2019; Sinclair et al., 2016). If larval and pupal survival rates responded moderately to temperature varying from 23 to 29°C, a dramatic acceleration of development of *S. littoralis* was observed, particularly between 23 and 27°C. This strong thermal sensitivity of the development rate explains that this species can complete two to seven generations per year depending on regional climatic conditions (Khafagi et al., 2016). Moreover, it was found that adults of *S. littoralis* cannot reproduce at a constant temperature of 30 °C (Sidibé & Laugé, 1977). This value of CTmax for reproduction seems also close to CTmax for pupal survival that Sidibé and Laugé estimated low at 30°C. This response is in contrast to the high pupal survival rates observed at 29 °C in other studies (Bagni et al., 2022; Massot et al., 2021) and gave evidence for the proximity of T<sub>opt</sub> and CT<sub>max</sub>.

### 2.2. Experimental setup

*S. littoralis* used in the study were obtained from a laboratory strain maintained at 23 °C, 60-70 % relative humidity, 16:8 light/dark photoperiod, and with larvae fed *ad libitum* with semiartificial food (Hinks & Byers, 1976). We obtained experimental

clutches by mating pairs of one female and one male (two-day-old adults) in plastic boxes (10 cm in diameter) with sugar water (20 g/L) as food and a strip of filter paper to collect the clutches easier. Clutches were collected at the peak of egg laying 24 hours after mating (Kehat & Gordon, 1975). Clutches were divided into two parts to rear them under the two different thermal regimes (constant *versus* fluctuating regimes) of a same mean temperature (25, 29 or 33°C). We used this design to avoid a sampling bias related to clutch effects (Massot et al., 2021) in our comparison between constant and fluctuating regimes. The fluctuating regime was a daily temperature fluctuation of  $\pm 5^\circ\text{C}$  (Figure S1). The daily fluctuation of  $\pm 5^\circ\text{C}$  is common in natural environments (Wang & Dillon, 2014) and commonly used in studies on fluctuating thermal regimes (Verheyen et al., 2022). We used environmental test chambers (Panasonic MLR-352H, France) to control temperatures independently of relative humidity, maintained at 70 %.

We performed a daily survey of experimental boxes (225 x 145 x 72 mm) to monitor larvae and pupae until adult emergence. We standardized density to 30 larvae per experimental box when larvae reached the 4<sup>th</sup> larval instar. The larval survival rate was measured from the 4<sup>th</sup> larval instar to pupation. Sex was identified at pupation and pupal survival was quantified. We measured also the developmental rate as 1/developmental duration ( $\text{days}^{-1}$ ) (Lyons et al., 2013; Paaajmans et al., 2013) between egg stage and adult emergence. Developmental rate can be used as a fitness proxy for generation time (Huey & Berrigan, 2001). Finally, we estimated the mating rate of two-day-old adults from mating pairs of one female and one male that were exposed to the same temperature treatment, as well as the hatching rate of clutches they produced. This experiment was performed in February 2020. It was complemented with an experiment in May-June 2022 to quantify the hatching rate of eggs at the beginning of the temperature treatments and the early larval survival rate of larvae between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> instars. These parameters were obtained using estimates of the number of eggs we obtained from the clutch mass (Figure S2:  $R^2 = 0.95$  for the relationship between the number of eggs and clutch mass). We counted

the number of hatched eggs to quantify the hatching rate and the number of larvae that reached the 4<sup>th</sup> larval instar to quantify the early larval survival rate.

### 2.3. Data analyses

Table S2 gives the sample sizes for all our variables in each of our six experimental treatments crossing the two thermal regimes and three mean temperatures. We tested the effects of thermal regime, mean temperature, and their interaction. We analysed all our variables using logistic models. In particular, we discretized our continuous variables (hatching rates, early larval survival rate, developmental rates) that did not satisfy to normality or homoscedasticity, even when log transformed. Hatching rates and early larval survival rate were discretized into binomial variables with regard to their median value. For developmental rates, we had to discretize them with regard to the median values of each mean temperature to maintain variation in analyses. Indeed, the overlapping between the developmental times of mean temperatures was very limited. The 99 % confidence interval of the developmental time of females was 0.0321-0.0324 days<sup>-1</sup> at 25 °C, 0.0416-0.0422 days<sup>-1</sup> at 29 °C, and 0.0459-0.0474 days<sup>-1</sup> at 33 °C, and the 99 % confidence interval of the developmental time of males was 0.0319-0.0323 days<sup>-1</sup> at 25 °C, 0.0418-0.0424 days<sup>-1</sup> at 29 °C, and 0.0452-0.0464 days<sup>-1</sup> at 33 °C. Analyses were carried out with JMP software (JMP Pro 15, SAS Institute Inc., Cary, NC), using stepwise removal of terms with  $P > 0.10$ .

Our fitness estimates were integrated into demographic models to estimate the multiplication rate at the population level (Caswell, 2001). In brief, the life cycle of *S. littoralis* was modelled with an age-structured matrix following the methodology detailed in Massot et al. (2021) and the asymptotic population growth rate was quantified by the dominant eigenvalue of the matrix. Modelling was achieved with the program ULM ('Unified Life Models') (Ferrière et al., 1996; Legendre & Clobert, 1995). The models corresponding to the six experimental treatments were parameterised with the fitness estimates of the study (Table S3).



## 2.4. Literature review on fitness traits in insects

We searched the literature for studies on fitness traits in insects that compared constant and daily fluctuating temperature with the same mean temperature between the two thermal regimes. We did not select studies with a marked asymmetrical fluctuation around the mean temperature nor studies based on daily alternating temperature (*i.e.*, with a rapid shift between only two temperatures). Although we observed an increasing number of studies that compared constant and daily fluctuating temperatures during the last decade, we found only 22 studies with our selected criteria (see the references listed in Table S1).

## 3. RESULTS

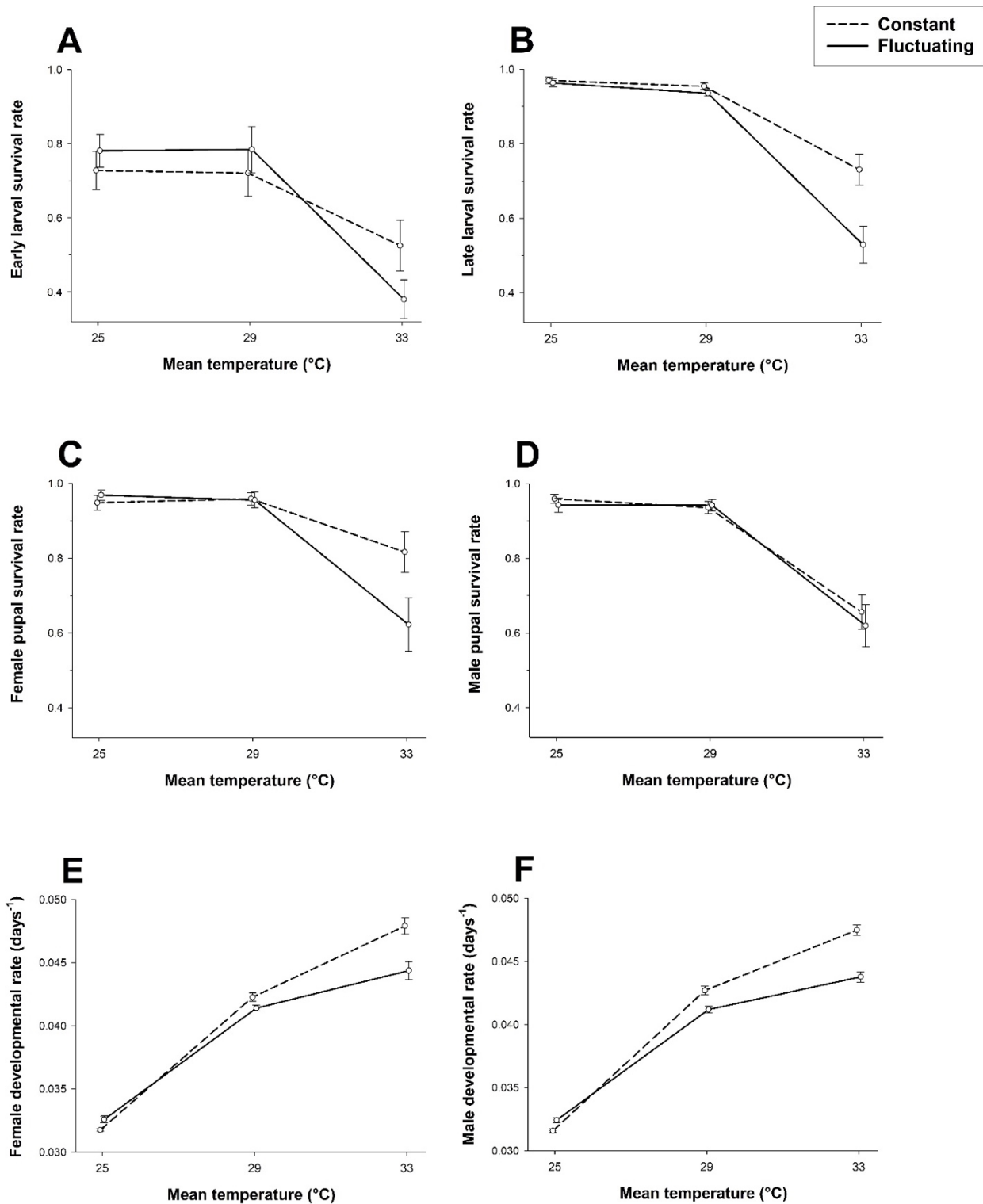
### 3.1. Comparison of constant and fluctuating temperatures in *Spodoptera littoralis*

Table 1 shows the tests of the effects of mean temperature (25, 29, and 33°C), thermal regime (constant *versus* fluctuating regimes), and their interaction. The nine fitness parameters tested were influenced by mean temperature ( $P < 0.001$  in all tests). If the developmental rates of females and males increased with temperature (Figures 2E and F), the seven other fitness parameters decreased at the highest temperature of 33°C (Figures 2A to D for the four survival rates tested, and Figure 3A to C for the three reproductive parameters tested). As we expected, these detrimental effects indicated that the developmental temperature of 33°C was close to CT<sub>max</sub> of *S. littoralis*. In addition, the analyses revealed significant interactions between the effects of mean temperature and thermal regime for female pupal survival rate and the developmental rates of females and males (Table 1). At the highest and detrimental temperature of 33°C, these fitness parameters were lower under the fluctuating thermal regime compared to constant temperature (Figures 2C, E and F). Moreover, we found a significant effect of thermal regime on late larval survival rate (Table 1). However, late larval survival rate was particularly lower under the fluctuating regime than at constant temperature at the mean temperature of 33°C (Figure 2B) as

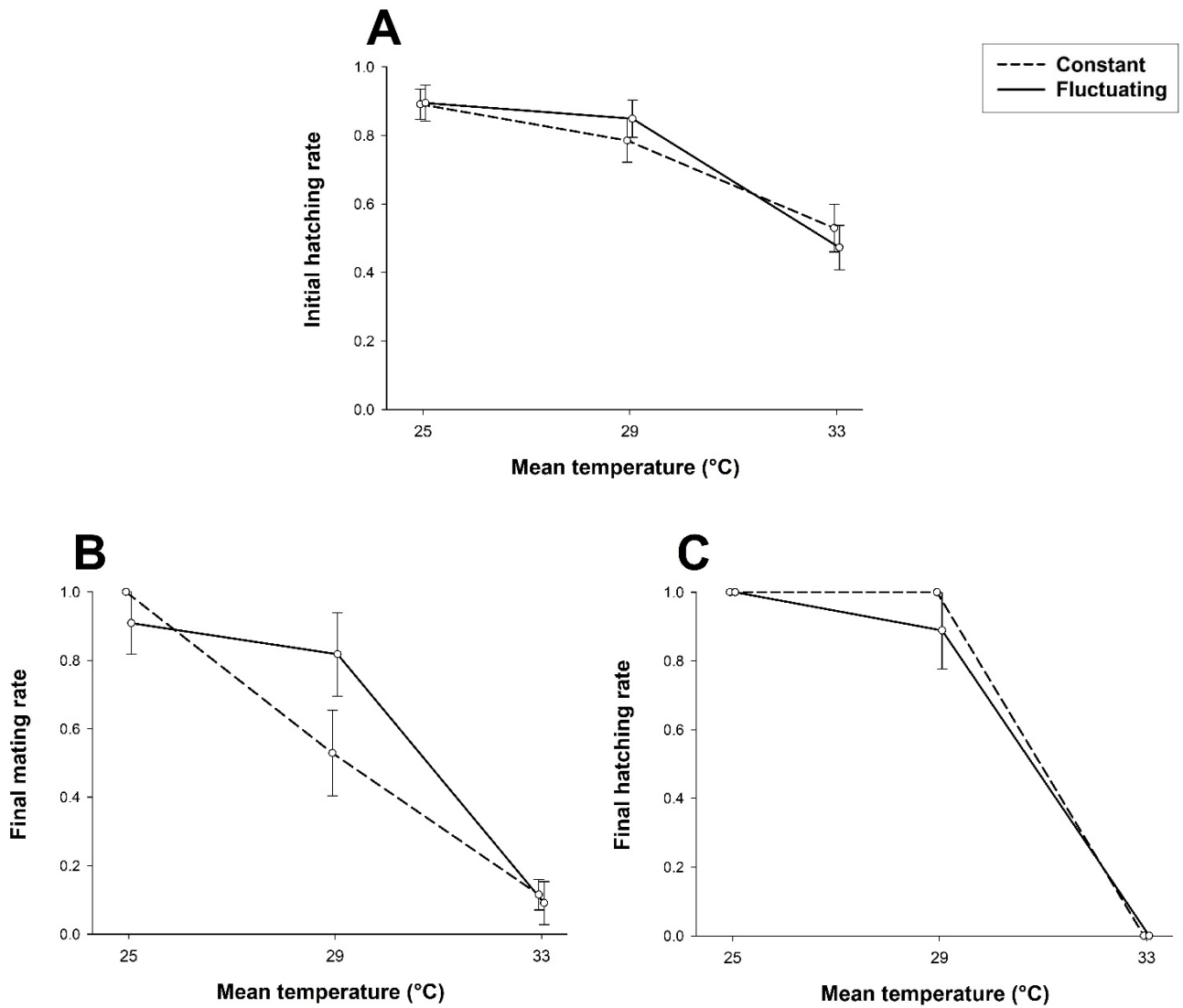
supported by the marginally significant interaction between the mean temperature and thermal regime (Table 1) and local tests per mean temperature (thermal regime effect with  $P < 0.001$  at 33°C, and  $P > 0.10$  at 25 and 29°C).

**TABLE 1** Influence of temperature in constant and fluctuating thermal regimes. Tests of the effects of mean temperature (25, 29, and 33°C), experimental thermal regime (constant *versus* fluctuating regimes  $\pm 5^\circ\text{C}$ ), and their interaction. Significant and marginally effects are reported in bold. The tests of the effect of mean temperature tested on female and male developmental rates were not reported because we had to discretize these variables with regard to the median value of each mean temperature (see Materials and Methods where the non-overlapping 99% confidence intervals between mean temperatures are indicated)

	Mean temperature	Temperature fluctuation	Interaction
Initial hatching rate	$X^2_2=46.7 P<0.001$	$X^2_1=0.7 P=0.417$	$X^2_2=2.0 P=0.360$
Early larval survival rate	$X^2_2=26.1 P<0.001$	$X^2_1=0.0 P=1.000$	$X^2_2=2.8 P=0.242$
Late larval survival rate	$X^2_2=439.5 P<0.001$	$X^2_1=10.3 P=0.001$	$X^2_2=5.1 P=0.079$
Female pupal survival rate	$X^2_2=79.6 P<0.001$	$X^2_1=0.5 P=0.460$	$X^2_2=8.0 P=0.018$
Male pupal survival rate	$X^2_2=161.3 P<0.001$	$X^2_1=0.6 P=0.448$	$X^2_2=0.7 P=0.699$
Female developmental rate	<b>Non-overlapping CI<sub>99%</sub></b>	$X^2_1=0.1 P=0.763$	$X^2_2=60.4 P<0.001$
Male developmental rate	<b>Non-overlapping CI<sub>99%</sub></b>	$X^2_1=1.7 P=0.199$	$X^2_2=96.9 P<0.001$
Final mating rate	$X^2_2=61.7 P<0.001$	$X^2_1=0.4 P=0.522$	$X^2_2=3.3 P=0.195$
Final hatching rate	$X^2_2=36.4 P<0.001$	$X^2_1=1.4 P=0.229$	$X^2_2<0.1 P=1.000$



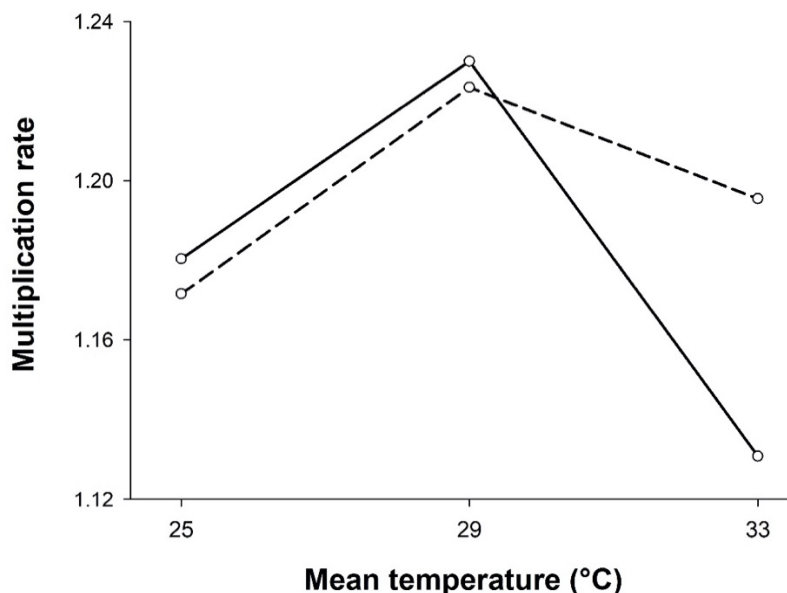
**FIGURE 2** Influence of mean temperature and thermal regime on survival and development. Thermal regimes are fluctuating (solid lines) and constant (dashed lines) temperatures. **A:** Early larval survival rate between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars, **B:** late larval survival rate between the 4<sup>th</sup> larval instar and pupation, **C:** female pupal survival rate, **D:** male pupal survival rate, **E:** developmental rate between egg stage and adult female emergence, **F:** developmental rate between egg stage and adult male emergence. Vertical lines are s.e.m. between clutches



**FIGURE 3** Influence of mean temperature and thermal regime on reproduction. Thermal regimes are fluctuating (solid lines) and constant (dashed lines) temperatures. **A:** Hatching rate of eggs at the beginning of the experiment, **B:** mating rate after the full life cycle under the temperature treatments, **C:** hatching rate of eggs after the full life cycle under the temperature treatments. Vertical lines are s.e.m. between clutches

### 3.2. Integrative estimate of fitness traits

Our fitness estimates were integrated into demographic models based on the life-cycle of *S. littoralis*. We simulated the six experimental scenarios that crossed the three mean experimental temperatures to the two thermal regimes (values used to fix parameters are reported in Table S3) to obtain their corresponding population multiplication rate. The multiplication rate of simulated populations was the highest at 29°C and its decrease at the higher temperature of 33°C was more marked under the fluctuating thermal regime (Figure 4). Therefore, the overall impact of the high temperature appeared underestimated under the constant thermal regime. This result was obtained from the modelling of the effects of mean temperatures and thermal regimes from egg stage to adult emergence (using the estimates of the initial hatching rate reported in Figure 3A). If we consider adult reproduction after the full life cycle under the temperature treatments, then multiplication rates will be to consider as nil at 33°C for both thermal regimes because adults were not able to reproduce at this temperature (Figure 3C).

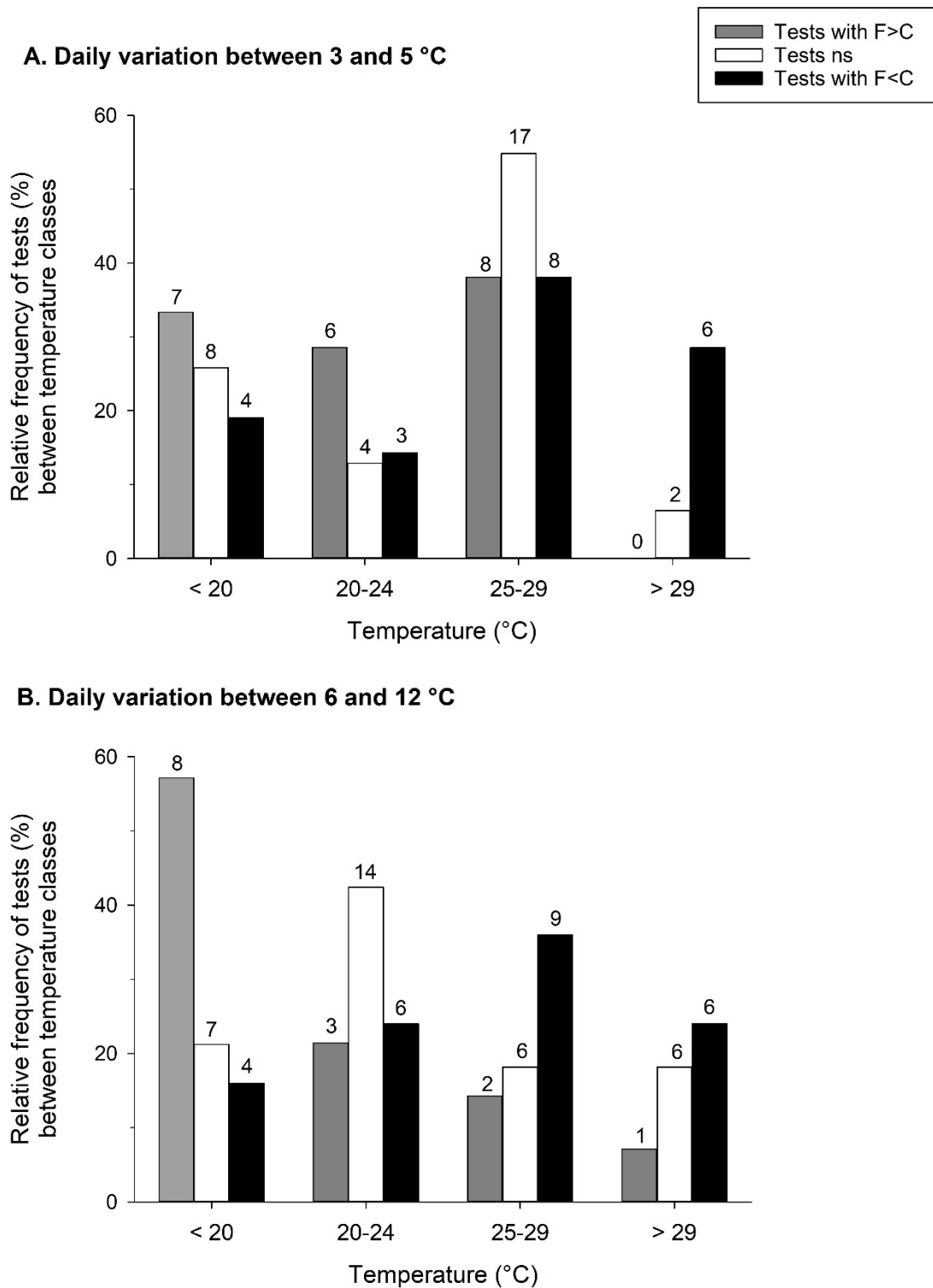


**FIGURE 4** The multiplication rate of simulated populations as a function of mean temperature and thermal regime. Thermal regimes are fluctuating (solid lines) and constant (dashed lines) temperatures

### 3.3. Review on fitness traits in insects

We reviewed the literature to compile studies on fitness traits in insects that provide statistical tests comparing constant and daily fluctuating temperatures (see our selection criteria in Materials and Methods). As an encouraging sign, we observed an increasing number of studies that compared constant and daily fluctuating temperatures during the last decade (Table S1). The main finding of our review is the reverse patterns between cold and hot temperatures (Figure 5). The fitness traits observed higher in fluctuating than constant regime were the most frequent in tests of cold temperatures. At the opposite, the fitness traits were more frequently lower in fluctuating regimes of hot temperatures.

In addition, interesting patterns were revealed by the comparison between daily variations from 3 to 5°C and daily variations from 6 to 12°C (Figures 5A vs 5B). Indeed, larger thermal variations tend to benefit organisms at low mean temperatures. For daily variations from 6 to 12°C, the number of cases with fitness traits higher in fluctuating than constant regime was particularly high with temperatures inferior to 20°C (Figure 5B). At the opposite, the comparison of daily variations at hot temperatures suggests that larger variations more exposes organisms to detrimental effects. If the number of cases with fitness traits lower in fluctuating than constant regime was dominant only with temperatures superior to 29°C for small daily variations (Figure 5A), it was also dominant with temperatures between 25 and 29°C for larger daily variations (Figure 5B).



**FIGURE 5** Synthesis from studies in insects that compared fitness traits between fluctuating and constant thermal regimes. **A:** Tests with a daily variation between 3 and 5°C, **B:** Tests with a daily variation between 6 and 12°C. From the results compiled from literature (Table S1), the figure shows the percentage of tests between four temperature classes for fitness traits significantly higher in fluctuating regime (tests with  $F > C$ ), non-significant results (tests ns), and fitness traits significantly lower in fluctuating regime (tests with  $F < C$ ). Numbers above the bars represent the number of tests

## 4. DISCUSSION

We studied *S. littoralis* at the relatively high temperatures 25, 29 and 33°C, a thermal range around  $T_{opt}$  that we found close to 29°C with multiplication rate estimates (Figure 4). The maximal limit of our thermal range was also close to  $CT_{max}$  as highlighted by the steep decrease of the multiplication rate under the fluctuating thermal regime at 33°C. Moreover, adults were not able to reproduce at 33°C (Figure 3C). The narrow thermal range between  $T_{opt}$  and  $CT_{max}$  is typical in ectotherms (Colinet et al., 2015; Martin & Huey, 2008; Paaijmans et al., 2013; Stoks et al., 2017). Investigate the fitness responses of ectotherms between these two close tipping points of the maximal and nil fitness values is crucial because a small temperature variation within this narrow range will lead to a severe fitness decline. It is also critical to study this range of high temperatures because heat waves become more frequent and severe with the current climate change (Fischer & Schär, 2010; Wang & Dillon, 2014).

### 4.1. Difference between constant and fluctuating temperatures in *Spodoptera littoralis*

We predicted lower fitness in fluctuating thermal regime compared to constant regime at optimal and high temperatures. However, we also expected a clearer difference at high than optimal temperature because of higher metabolic cost and  $CT_{max}$  closeness (Figure 1), even if this prediction might be falsified by a strong effect of Jensen's inequality around  $T_{opt}$ . We found well a lower fitness in fluctuating than constant regime at our high temperature of 33°C, giving evidence for the predominant effect of metabolic cost or/and  $CT_{max}$  closeness at high temperature. Moreover, we did not find a difference between fluctuating and constant regimes at the optimal temperature of 29°C. This lack of difference at the optimal temperature seems to give evidence for limited effects of Jensen's inequality and metabolic cost (Figure 1A). This observation in *S. littoralis* is in accordance with the diversity of results showed in our



literature review on the 25-29°C temperature class with daily thermal variation between 3 and 5°C (Figure 5A), *i.e.*, from tests with experimental conditions similar to the ones investigated in our study.

An alternative to the hypothesis of limited effects of Jensen's inequality and metabolic cost around the optimal temperature is that trade-offs between fitness traits and delayed responses of acclimation may influence the effects of fluctuating temperatures. Indeed, the responses of fitness traits can be non-independent because of energetic or evolutionary trade-offs (Arias et al., 2011; Marshall & Sinclair, 2010) such as trade-offs between survival and reproduction or between early and late survival (Stearns, 1992). The negative relationships between fitness traits associated with these trade-offs might decrease, cancel out, or even reverse the difference between fluctuating and constant thermal regimes. The delayed responses of acclimation could also obscure the effects of fluctuating temperatures notably because past stressful temperatures can increase the thermal range of organisms (Colinet et al., 2015). These delayed responses can even change the trade-off between survival and reproduction (Marshall & Sinclair, 2010) or between early and late survival (Arias et al., 2011). This complexity challenges the predictions that can be made for temperatures not too close to extreme critical temperatures  $CT_{min}$  and  $CT_{max}$  where detrimental effects should predominate, and this complexity might explain the diversity of results under medium experimental temperatures (20-24 and 25-29°C temperature classes in Figure 5).

#### **4.2. Literature review in insects**

The difference between constant and daily fluctuating temperatures should depend on the mean temperature studied and breadth of variation in fluctuating temperatures (Colinet et al., 2015; Stoks et al., 2017). Our literature review on fitness traits showed these two influences. For the influence of the mean temperature studied, the review revealed opposite patterns between cold and hot temperatures. Compared to constant regimes, fitness traits were more frequently higher in fluctuating regimes of

cold temperatures and lower in fluctuating regimes of hot temperatures (Figure 5). Therefore, ignore daily fluctuations of temperature in studies using constant temperatures lead often to underestimate fitness traits in cold conditions and overestimate fitness traits in hot conditions. This reverse pattern was predicted by Stoks et al. (2017) based on the influence of Jensen's inequality and critical temperature  $CT_{max}$ . Concerning the influence of the breadth of variation in fluctuating temperatures, two effects are expected depending on the mean temperature considered. For mean temperatures close to critical temperatures, a larger thermal fluctuation may allow organisms to benefit of favourable temperatures to counterbalance the negative effects of  $CT_{min}$  or  $CT_{max}$  (Colinet et al., 2015). For mean temperatures distant from these critical temperatures, a larger thermal fluctuation more exposes organisms to negative effects of  $CT_{min}$  or  $CT_{max}$ . The comparison of small and large daily thermal variations (Figures 5A vs 5B) suggests that larger daily variations benefit organisms at low mean temperatures and more expose organisms to negative effects of  $CT_{max}$  at high mean temperatures. The opposite effect of larger thermal variations between low and high temperatures was also a trend described by Colinet et al. (2015). In their review, Colinet et al. discussed the diversity of mechanisms that could explain the effects of fluctuating temperatures around critical extremes  $CT_{min}$  and  $CT_{max}$ . They suggested that the benefits of larger thermal variations close to  $CT_{min}$  are mainly to provide warmer periods allowing to repair chilling injuries or increase the production of cryoprotectants. They indicated that organisms seem to have less opportunity to repair or cope the negative effects of extreme heat events.

### **4.3. Conclusions**

Although there is an increasing number of studies investigating the effects of the daily fluctuations of temperature (Colinet et al., 2015; Stoks et al., 2017), most laboratory studies remain carried out under constant temperatures. Our study should encourage researchers to give up the assumption that constant temperatures have insignificant effects. In the context of climate warming, ignore daily fluctuations of

temperature will often overestimate fitness traits in hot conditions. As a consequence, this bias will lead to underestimate the expected impact of climate warming on fitness traits. Furthermore, the current climate change associates an increase of daily thermal fluctuations to the increase of mean temperatures (Wang & Dillon, 2014). As suggested by our literature review, the increase of daily thermal fluctuations could more exposes organisms to negative effects of high temperatures. Future studies should investigate the combined effects between mean fluctuating temperatures and daily fluctuation ranges.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Région Ile-de-France (*Réseau de Recherche sur le Développement Soutenable*, DIM R2DS 2014).

## **REFERENCES**

Les références de ce manuscrit ont été intégrées aux références globales de la thèse et sont présentées en page 181.

## Appendixes

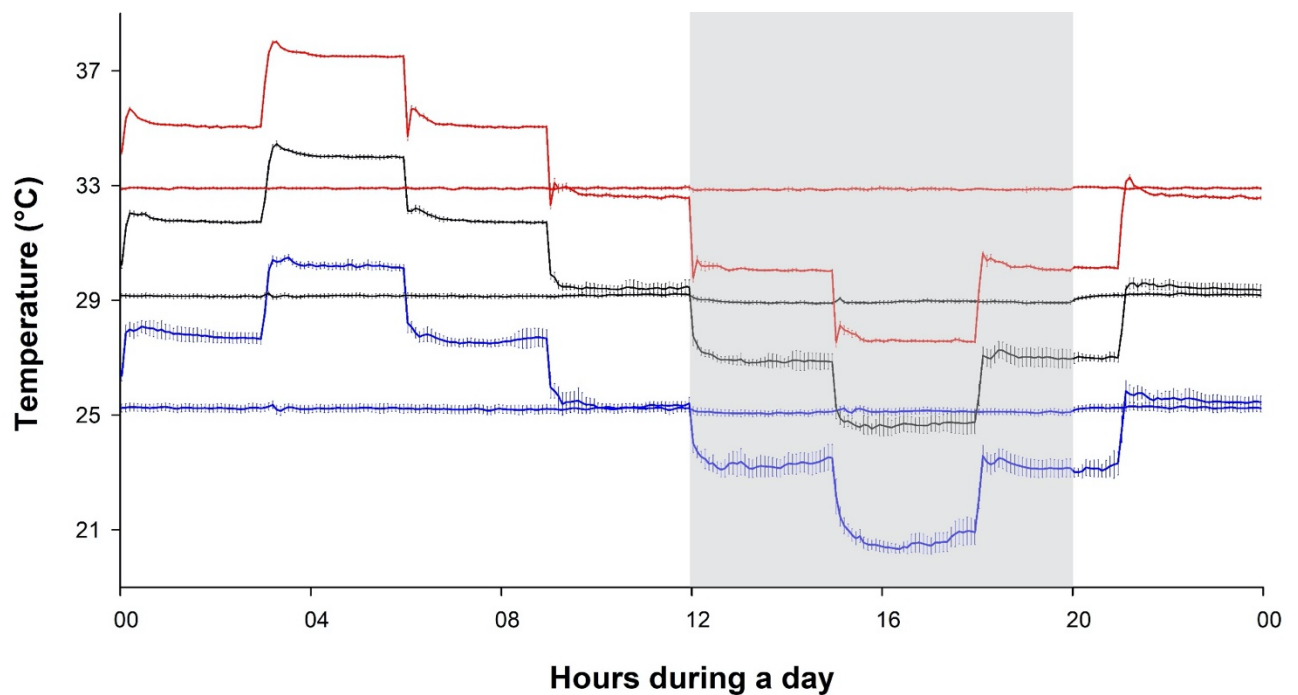
Figure S1 - Experimental temperatures

Figure S2 – Estimation of the number of eggs

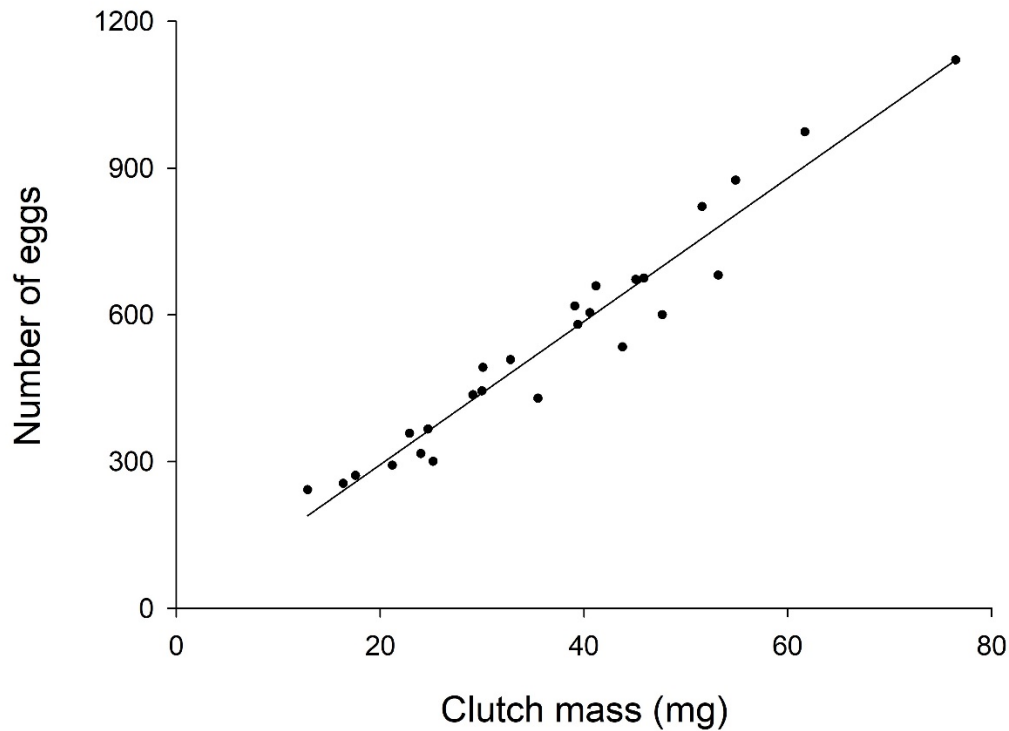
Table S1 - Review of the studies that compared fitness traits in insects

Table S2 - Sample sizes

Table S3 - Values used to fix parameters in matrix models



**Figure S1.** The six experimental temperatures measured in environmental test chambers. Temperatures were fixed at 25 (blue), 29 (black), and 33°C (red) in constant and fluctuating ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) regimes. Mean values and 95% confidence intervals (vertical bars) were estimated over 24 h of measurements performed each five minutes during three weeks using Vaisala HMP110 Temperature probes. For logistic reasons to study the nocturnal moth *S. littoralis*, the scotophase (grey area of the figure) of the 16/8 light/dark cycle was fixed from 12 to 20h.



**Figure S2.** Relationship between the number of eggs and clutch mass.  $R = 0.971$ ,  $N = 26$ , Number of eggs =  $0.492 + 14.645 \times \text{Clutch mass}$ . The relationship was significant ( $P < 0.001$ ) and intercept did not significantly differ from 0 ( $P = 0.987$ ).

**Table S1.** Review of the studies that compared fitness traits between constant and fluctuating thermal regimes in insects. The results of the comparison between constant (C) and daily fluctuating temperatures (F) are reported according to fitness trait, mean temperature and daily variation studied. The references (Ref.) are listed below the table.

Ref.	Species	Fitness trait	Mean temperature	Daily variation	Result
1	<i>Spodoptera littoralis</i>	Larval survival	25°C	± 5°C	ns
		Larval survival	29°C	± 5°C	ns
		Larval survival	33°C	± 5°C	F<C
		Pupal survival	25°C	± 5°C	ns
		Pupal survival	29°C	± 5°C	ns
		Pupal survival	33°C	± 5°C	F<C in ♀
		Developmental rate	25°C	± 5°C	F>C
		Developmental rate	29°C	± 5°C	F<C
		Developmental rate	33°C	± 5°C	F<C
		Reproduction	25°C	± 5°C	ns
		Reproduction	29°C	± 5°C	ns
		Reproduction	33°C	± 5°C	ns
		2	<i>Grapholita molesta</i>	Developmental rate	25°C
Larval survival	25 °C			± 5°C	F<C
Pupal survival	25 °C			± 5°C	F>C
Reproduction	25 °C			± 5°C	F>C

3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Egg to adult survival	20°C	± 3.5°C	ns
		Egg to adult survival	20°C	± 5°C	ns
3	<i>Leptopilina bouleardi</i>	Developmental rate	20°C	± 3.5°C	F>C
		Developmental rate	20°C	± 5°C	F>C
		Success of parasitism	20°C	± 3.5°C	F>C
		Success of parasitism	20°C	± 5°C	F>C
4	<i>Culex pipiens</i>	Larval survival	20°C	± 3.5°C	ns
		Larval survival	20°C	± 7°C	ns
		Adult survival	20°C	± 3.5°C	ns
		Adult survival	20°C	± 7°C	ns
5	<i>Lycaena tityrus</i>	Developmental rate	18 °C	± 5°C	F>C
		Developmental rate	24°C	± 5°C	F>C
6	<i>Venturia canescens</i>	Fertility	20°C	± 4°C	F<C
		Fertility	25°C	± 4°C	F<C
		Fertility	30°C	± 4°C	ns
		Adult longevity	20°C	± 4°C	F>C
		Adult longevity	25°C	± 4°C	ns
7	<i>Scatophaga stercoraria</i>	Adult longevity	30°C	± 4°C	F<C
		Egg to adult survival	18°C	± 3°C	ns
		Egg to adult survival	18°C	± 6°C	F<C
		Developmental rate	18°C	± 3°C	ns
		Developmental rate	18°C	± 6°C	F<C
		Adult longevity	18°C	± 3°C	ns

8	<i>Anopheles arabiensis</i>	Adult longevity	18°C	± 6°C	ns
		Survival	25°C	± 5°C	ns
		Survival	25°C	± 10°C	F<C
		Developmental rate	25°C	± 5°C	F>C
		Developmental rate	25°C	± 10°C	ns
8	<i>Anopheles funestus</i>	Egg to adult survival	25°C	± 5°C	F<C
		Egg to adult survival	25°C	± 10°C	F<C
		Developmental rate	25°C	± 5°C	F<C
		Developmental rate	25°C	± 10°C	F<C
9	<i>Drosophila melanogaster</i>	Male mating success	25°C	± 4°C	F>C
		Male mating success	29°C	± 4°C	F<C
		Male fertility	25°C	± 4°C	ns
		Male fertility	29°C	± 4°C	F<C
		Male offspring production	25°C	± 4°C	ns
		Male offspring production	29°C	± 4°C	F<C
10	<i>Wyeomyia smithii</i>	Larval survival	20°C	± 8°C	ns
		Larval survival	27°C	± 8°C	ns
		Developmental rate	20°C	± 8°C	ns
		Developmental rate	27°C	± 8°C	F<C
11	<i>Rhpdnius prolixus</i>	Survival	24°C	± 7°C	F<C
		Fertility	24°C	± 7°C	ns



12	<i>Drosophila birchii</i>	Fecundity	24°C	± 7°C	F<C
		Developmental rate	24°C	± 7°C	ns
12	<i>Drosophila birchii</i>	Male reproductive success	17°C	± 3°C	ns
		Male reproductive success	24°C	± 3°C	F<C
13	<i>Cotesia congregata</i>	Survival	25°C	± 10°C	F<C
		Survival	28°C	± 10°C	F<C
		Survival	30°C	± 10°C	F<C
		Developmental rate	25°C	± 10°C	F<C
		Developmental rate	28°C	± 10°C	F<C
		Developmental rate	28°C	± 10°C	F<C
14	<i>Anopheles stephensi</i>	Survival	18°C	± 4°C	F>C
		Survival	18°C	± 6°C	F>C
		Survival	26°C	± 4°C	ns
		Survival	26°C	± 6°C	ns
		Survival	32°C	± 4°C	F<C
		Survival	32°C	± 6°C	F<C
		Developmental rate	18°C	± 4°C	F>C
		Developmental rate	18°C	± 6°C	F>C
		Developmental rate	26°C	± 4°C	ns
		Developmental rate	26°C	± 6°C	ns
		Developmental rate	32°C	± 4°C	F<C
		Developmental rate	32°C	± 6°C	F<C

15	<i>Chironomus dilutus</i>	Survival	24°C	± 5°C	F<C
16	<i>Dysaphis plantaginea</i>	Longevity	12°C	± 5°C	ns
		Developmental rate	12°C	± 5°C	F>C
		Fecundity	12°C	± 5°C	ns
		Success of parasitism	12°C	± 5°C	F>C
17	<i>Protophormia terraenovae</i>	Developmental rate	12°C	± 5°C	F>C
		Longevity	12°C	± 5°C	ns
		Developmental rate	16°C	± 12°C	F>C
18	<i>Plutella xylostella</i>	Larval survival	7°C	± 7°C	ns
		Larval survival	22°C	± 7°C	ns
		Larval survival	30°C	± 7°C	ns
		Pupal survival	22°C	± 7°C	ns
		Pupal survival	30°C	± 7°C	ns
		Adult longevity	7°C	± 7°C	ns
		Adult longevity	22°C	± 7°C	ns
		Adult longevity	30°C	± 7°C	ns
		Developmental rate	7°C	± 7°C	F>C
19	<i>Diadegma insulare</i>	Developmental rate	22°C	± 7°C	ns
		Developmental rate	30°C	± 7°C	ns
		Success of parasitism	7°C	± 7°C	ns
		Success of parasitism	22°C	± 7°C	ns
		Success of parasitism	30°C	± 7°C	ns
		Pupal survival	22°C	± 7°C	ns

Pupal survival	30°C	± 7°C	F<C
Adult longevity	7°C	± 7°C	F<C
Adult longevity	22°C	± 7°C	F<C
Adult longevity	30°C	± 7°C	ns
Developmental rate	7°C	± 7°C	F>C
Developmental rate	22°C	± 7°C	F>C
Developmental rate	30°C	± 7°C	F>C

19 *Xylotrechus arvicola*

Egg survival	15°C	± 3°C	F<C
Egg survival	18°C	± 6°C	F<C
Egg survival	21°C	± 6.5°C	F<C
Egg survival	30°C	± 6.5°C	F<C
Egg developmental rate	15°C	± 3°C	ns
Egg developmental rate	18°C	± 6°C	F>C
Egg developmental rate	21°C	± 6.5°C	F<C
Egg developmental rate	30°C	± 6.5°C	F<C

20 *Osmia bicornis*

Egg survival	17.5°C	± 7.5°C	ns
Egg survival	22.5°C	± 7.5°C	ns
Egg survival	27.5°C	± 7.5°C	ns
Larval survival	17.5°C	± 7.5°C	ns
Larval survival	22.5°C	± 7.5°C	F<C
Larval survival	27.5°C	± 7.5°C	F<C
Pupal survival	17.5°C	± 7.5°C	ns
Pupal survival	22.5°C	± 7.5°C	ns
Pupal survival	27.5°C	± 7.5°C	ns

21	<i>Tribolium castaneum</i>	Adult survival	17.5°C	± 7.5°C	F>C
		Adult survival	22.5°C	± 7.5°C	F>C
		Adult survival	27.5°C	± 7.5°C	F>C
		Developmental rate	17.5°C	± 7.5°C	F>C
		Developmental rate	22.5°C	± 7.5°C	F>C
		Developmental rate	27.5°C	± 7.5°C	F>C
22	<i>Trogoderma inclusum</i>	Fecundity	25°C	± 5°C	ns
		Developmental rate	25°C	± 5°C	F>C
		Fecundity	25°C	± 5°C	ns
		Developmental rate	25°C	± 5°C	F>C
22	<i>Sitophilus oryzae</i>	Fecundity	25°C	± 5°C	ns
		Developmental rate	25°C	± 5°C	ns
		Developmental rate	8°C	± 3°C	F<C
		Developmental rate	12°C	± 3°C	F<C
23	<i>Drosophila melanogaster</i>	Developmental rate	16°C	± 3°C	F<C
		Developmental rate	18°C	± 4°C	F>C
		Developmental rate	25°C	± 4°C	ns
		Developmental rate	25°C	± 4°C	ns

## REFERENCES

1 **The present study**; 2 (Z.-Z. Chen et al., 2018) ; 3 (Delava et al., 2016); 4 (Delnat et al., 2019); 5 (Fischer et al., 2011); 6 (Foray et al., 2014); 7 (Kjærsgaard et al., 2012); 8 (Lyons et al., 2013); 9 (Rodrigues et al., 2022); 10 (Ragland & Kingsolver, 2008); 11 (Rolandi & Schilman, 2018); 12 (Saxon et al., 2018); 13 (Moore et al., 2021); 14 (Paaijmans et al., 2013); 15 (Willming et al., 2013); 16 (Tougeron et al., 2021); 17 (Warren & Anderson, 2013); 18 (Bahar et al., 2012); 19 (García-Ruiz et al., 2011); 20 (Radmacher & Strohm, 2011); 21 (Hagstrum & Leach, 1973) ; 22 (W. Chen et al., 2019) ; 23 (Czarnoleski et al., 2013)

Bahar, M. H., Soroka, J. J., & Dossdall, L. M. (2012). Constant versus fluctuating temperatures in the interactions between *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and its larval parasitoid *Didegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environmental Entomology*, *41*(6), 1653–1661. <https://doi.org/10.1603/EN12156>

Chen, W., Yang, L., Ren, L., Shang, Y., Wang, S., & Guo, Y. (2019). Impact of constant versus fluctuating temperatures on the development and life history parameters of *Aldrichina grahami* (Diptera: Calliphoridae). *Insects*, *10*(7), 184. <https://doi.org/10.3390/insects10070184>

Chen, Z.-Z., Xu, L.-X., Li, L.-L., Wu, H.-B., & Xu, Y.-Y. (2018). Effects of constant and fluctuating temperature on the development of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, *109*(2), 212–220. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000469>

Czarnoleski, M., Cooper, B. S., Kierat, J., & Angilletta, M. J., Jr. (2013). Flies developed small bodies and small cells in warm and in thermally fluctuating environments. *Journal of Experimental Biology*, *216*(15), 2896–2901. <https://doi.org/10.1242/jeb.083535>

Delava, E., Fleury, F., & Gibert, P. (2016). Effects of daily fluctuating temperatures on the *Drosophila-Leptopilina bouvardi* parasitoid association. *Journal of Thermal Biology*, *60*, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.06.012>

Delnat, V., Tran, T. T., Verheyen, J., Van Dinh, K., Janssens, L., & Stoks, R. (2019). Temperature variation magnifies chlorpyrifos toxicity differently between larval and adult mosquitoes. *Science of The Total Environment*, *690*, 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.030>

- Fischer, K., Kölzow, N., Höltje, H., & Karl, I. (2011). Assay conditions in laboratory experiments: Is the use of constant rather than fluctuating temperatures justified when investigating temperature-induced plasticity? *Oecologia*, *166*(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1917-0>
- Foray, V., Desouhant, E., & Gibert, P. (2014). The impact of thermal fluctuations on reaction norms in specialist and generalist parasitic wasps. *Functional Ecology*, *28*(2), 411–423. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12171>
- García-Ruiz, E., Marco, V., & Pérez-Moreno, I. (2011). Effects of variable and constant temperatures on the embryonic development and survival of a new grape pest, *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environmental Entomology*, *40*(4), 939–947. <https://doi.org/10.1603/EN11080>
- Hagstrum, D. W., & Leach, C. E. (1973). Role of constant and fluctuating temperatures in determining development time and fecundity of three species of stored-products Coleoptera. *Annals of the Entomological Society of America*, *66*(2), 407–410. <https://doi.org/10.1093/aesa/66.2.407>
- Kjærsgaard, A., Pertoldi, C., Loeschcke, V., & Blanckenhorn, W. U. (2012). The effect of fluctuating temperatures during development on fitness-related traits of *Scatophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae). *Environmental Entomology*, *42*(5), 1069–1078. <https://doi.org/10.1603/EN13074>
- Lyons, C. L., Coetzee, M., & Chown, S. L. (2013). Stable and fluctuating temperature effects on the development rate and survival of two malaria vectors, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*, *6*(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-104>
- Moore, M. E., Hill, C. A., & Kingsolver, J. G. (2021). Differing thermal sensitivities in a host–parasitoid interaction: High, fluctuating developmental temperatures produce dead wasps and giant caterpillars. *Functional Ecology*, *35*(3), 675–685. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13748>
- Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C., & Thomas, M. B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology*, *19*(8), 2373–2380. <https://doi.org/10.1111/gcb.12240>
- Radmacher, S., & Strohm, E. (2011). Effects of constant and fluctuating temperatures on the development of the solitary bee *Osmia bicornis* (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie*, *42*(6), 711–720. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0078-9>

- Ragland, G. J., & Kingsolver, J. G. (2008). The effect of fluctuating temperatures on ectotherm life-history traits: Comparisons among geographic populations of *Wyeomyia smithii*. *Evolutionary Ecology Research*, *10*(1), 29–44.
- Rodrigues, L. R., McDermott, H. A., Villanueva, I., Djukarić, J., Ruf, L. C., Amcoff, M., & Snook, R. R. (2022). Fluctuating heat stress during development exposes reproductive costs and putative benefits. *Journal of Animal Ecology*, *91*(2), 391–403. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13636>
- Rolandi, C., & Schilman, P. E. (2018). The costs of living in a thermal fluctuating environment for the tropical haematophagous bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Thermal Biology*, *74*, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.022>
- Saxon, A. D., O'Brien, E. K., & Bridle, J. R. (2018). Temperature fluctuations during development reduce male fitness and may limit adaptive potential in tropical rainforest *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, *31*(3), 405–415. <https://doi.org/10.1111/jeb.13231>
- Tougeron, K., Ferrais, L., Renard, M.-E., & Hance, T. (2021). Effects of constant versus fluctuating temperatures on fitness indicators of the aphid *Dysaphis plantaginea* and the parasitoid *Aphidius matricariae*. *Insects*, *12*(10), 855. <https://doi.org/10.3390/insects12100855>
- Warren, J.-A., & Anderson, G. S. (2013). Effect of fluctuating temperatures on the development of a forensically important blow fly, *Protophormia terraenovae* (Diptera: Calliphoridae). *Environmental Entomology*, *42*(1), 167–172. <https://doi.org/10.1603/EN12123>
- Willming, M. M., Qin, G., & Maul, J. D. (2013). Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(12), 2738–2745. <https://doi.org/10.1002/etc.2354>

**Table S2.** Sample sizes for the three mean temperatures and two thermal regimes (constant *versus* fluctuating temperatures).

	25°C		29°C		33°C	
	Constant	Fluctuating	Constant	Fluctuating	Constant	Fluctuating
Initial hatching rate	23	23	23	23	24	24
Early larval survival rate	23	23	23	23	24	24
Late larval survival rate	600	600	480	510	360	435
Female pupal survival rate	251	256	194	224	109	90
Male pupal survival rate	271	262	234	225	154	134
Female developmental rate	129	145	186	200	85	56
Male developmental rate	101	146	219	198	88	83
Mating rate	7	11	17	11	52	22
Final hatching rate	7	10	9	9	6	2

**Table S3.** Estimates of the parameters used in matrix models for the three mean temperatures and two thermal regimes. For the parameters indicated with \*, we used estimates obtained in Malbert-Colas et al. (2020).

	25°C		29°C		33°C	
	Constant	Fluctuating	Constant	Fluctuating	Constant	Fluctuating
Duration of incubation period (days)	3	3	2	2	2	2
Duration 1 <sup>st</sup> - 4 <sup>th</sup> instars (days)	7	6	5	5	4	5
Duration 4 <sup>th</sup> instar - pupation (days)	10	9	9	9	9	9
Duration of pupal period (days)	12	13	8	8	6	7
Survival from 1 <sup>st</sup> to 4 <sup>th</sup> instars (%)	72.8	78.1	72.1	78.5	52.5	38.0
Survival from 4 <sup>th</sup> instar to pupation (%)	97.0	96.3	95.4	93.5	73.1	52.9
Pupal survival (%)	94.8	96.9	95.9	95.5	81.7	62.2
Sex-ratio (% of females)	48.1	49.4	45.3	49.9	41.4	40.9
Adult female survival until laying (%) *	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8
Laying success after mating (%)	100.0	90.9	52.9	81.8	11.5	9.1
Number of eggs laid *	371	371	371	371	371	371
Hatching success (%)	89.1	89.5	78.5	84.9	53.0	47.3

**Reference:** Malbert-Colas A., Drozd T., Massot M., Bagni T., Chertemps T., Maria T., Maïbèche M., Siauxsat D. 2020. Effects of low concentrations of deltamethrin are dependent on developmental stages and sexes in the pest moth *Spodoptera littoralis*. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 41893-901. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10181-9>



## B. Étude d'une température intermédiaire et de l'état hydrique des adultes

Dans la continuité de la partie précédente  $V_A$ , cette expérimentation a été réalisée sur des températures fluctuantes de  $\pm 5^\circ\text{C}$  autour des températures moyennes. Mes précédentes expérimentations (parties  $IV_A$ ,  $IV_B$  et  $V_A$ ) ont indiqué que la température optimale de *S. littoralis* se trouvait proche de  $29^\circ\text{C}$  et que la température de  $33^\circ\text{C}$  était proche de sa limite thermique maximale. En plus des précédentes températures moyennes de 25, 29 et  $33^\circ\text{C}$ , l'étude a porté sur la température moyenne de  $31^\circ\text{C}$ , l'objectif étant de préciser la réponse de l'espèce dans la zone critique des températures élevées où les réponses peuvent varier considérablement entre température optimale et température maximale. En effet, c'est dans cette zone que les réponses des paramètres sont prédites les plus importantes (Colinet et al. 2015; Martin & Huey 2008; Paaijmans et al. 2013; Stoks et al. 2017). Un autre objectif de ma seconde expérimentation sur les températures fluctuantes était de conforter les estimations obtenues dans l'étude  $V_A$  en répliquant les températures de développement de 25, 29 et  $33^\circ\text{C}$ . Enfin, l'expérimentation a aussi été l'occasion de collecter des données de poids sec d'adultes, en plus de leur poids frais. Ceci pour donner de premiers éléments sur l'influence de la température sur l'état hydrique des individus après tout un cycle de développement sous différentes températures journalières fluctuantes.

### Méthodologie

Étant donné des contraintes logistiques liées à une période où j'ai effectué une mission d'enseignement, cette expérimentation a dû être réalisée sur deux périodes en 2021, avec des pontes obtenues du 21 janvier au 05 mars puis du 15 avril au 13 mai (en comptant plus ou moins un mois supplémentaire pour le développement des dernières pontes jusque à la pesée au stade adulte). Au total, 31 pontes ont été collectées sur 21 jours différents. Ceci peut en fait être considéré comme un avantage du point de vue du degré de généralité des résultats en regard de la variabilité que j'ai observé entre les dates de ponte (Bagni et al. 2020, 2022 ; Massot et al. 2021). A noter que ce facteur a aussi été pris en compte dans l'ensemble de mes travaux de thèse où la collecte des pontes expérimentales a toujours été étalée sur plusieurs semaines.

Les pontes ont été obtenues par accouplements contrôlés comme présenté dans le chapitre III sur la méthodologie. Afin de minimiser un éventuel biais d'échantillonnage dû à une variabilité entre mes pontes expérimentales, je les ai séparées en deux entre 25 et 31°C pour certaines, et entre 29 et 33°C pour les autres. Après éclosion, j'ai laissé les larves se développer jusqu'au stade L4 où des lots de 15 larves ont été sélectionnés pour réduire et standardiser la densité dans les boîtes expérimentales. Ces larves ont ensuite été suivies jusqu'au passage en chrysalide, puis jusqu'à l'émergence des adultes. J'ai pu ainsi mesurer les mêmes paramètres que dans l'expérimentation de la partie V<sub>A</sub>, à l'exception des paramètres de reproduction tout à la fin du cycle de développement (succès d'accouplement et succès d'éclosion de la seconde génération). En plus de ma mesure habituelle du poids frais, j'ai mesuré le poids sec des adultes. Ceci m'a permis de quantifier la teneur en eau des adultes ayant fait tout leur développement dans les différents régimes thermiques fluctuants. La teneur en eau (poids frais – poids sec) a été exprimée en pourcents du poids frais.

## Résultats

Le tableau 1 montre les résultats des tests réalisés sur les différents paramètres mesurés. La température de développement, en régime journalier fluctuant de  $\pm 5^\circ\text{C}$ , a significativement affecté l'ensemble des paramètres, à l'exception de la masse corporelle des mâles. L'examen détaillé de ces effets de la température sur chacun des paramètres va permettre de juger s'ils ont été comparables à ceux de la précédente expérimentation (partie V<sub>A</sub>).

**TABLEAU 1.** Influence de la température de développement sur l'ensemble des paramètres étudiés. Les températures testées étaient 25, 29, 31 et 33°C avec  $\pm 5^\circ\text{C}$  autour des moyennes journalières. Les tests significatifs sont indiqués en gras.

	Effet température	
Taux d'éclosion <sup>1</sup>	$\chi^2_3 = 37,2$	$P < 0,001$
Taux de survie larvaire précoce <sup>1</sup>	$\chi^2_3 = 58,0$	$P < 0,001$
Taux de survie larvaire tardive <sup>2</sup>	$\chi^2_3 = 110,3$	$P < 0,001$
Taux de survie nymphal des femelles <sup>2</sup>	$\chi^2_3 = 50,3$	$P < 0,001$
Taux de survie nymphal des mâles <sup>2</sup>	$\chi^2_3 = 36,9$	$P < 0,001$
Durée totale de développement des femelles <sup>1</sup>	$\chi^2_3 = 384,1$	$P < 0,001$
Durée totale de développement des mâles <sup>1</sup>	$\chi^2_3 = 422,8$	$P < 0,001$
Masse corporelle des femelles <sup>3</sup>	$F^2_{3,29} = 6,5$	$P = 0,002$
Poids sec des femelles <sup>3</sup>	$F^2_{3,29} = 7,7$	$P < 0,001$
Pourcentage de teneur en eau des femelles <sup>3</sup>	$F^2_{3,29} = 3,2$	$P = 0,040$
Masse corporelle des mâles <sup>4</sup>	$F^2_{3,36} = 1,8$	$P = 0,174$
Poids sec des mâles <sup>3</sup>	$F^2_{3,36} = 3,2$	$P = 0,035$
Pourcentage de teneur en eau des mâles <sup>3</sup>	$F^2_{3,36} = 4,3$	$P = 0,011$

<sup>1</sup> Test de Kruskal-Wallis pour variable continue avec distribution non normale

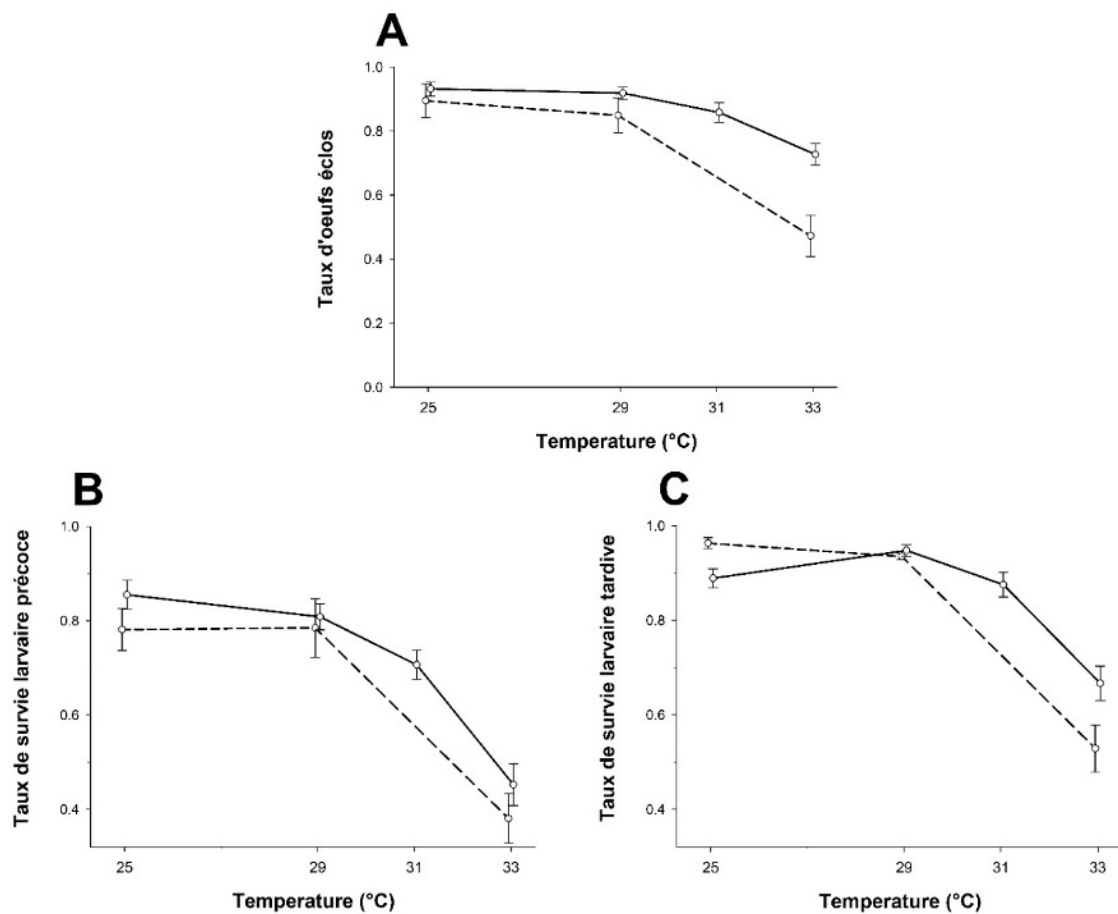
<sup>2</sup> Test de  $\chi^2$  pour variable binomiale

<sup>3</sup> Analyse de variance à un facteur pour variable continue avec distribution normale

<sup>4</sup> Analyse de variance à un facteur sur le Log de la variable pour satisfaire la normalité

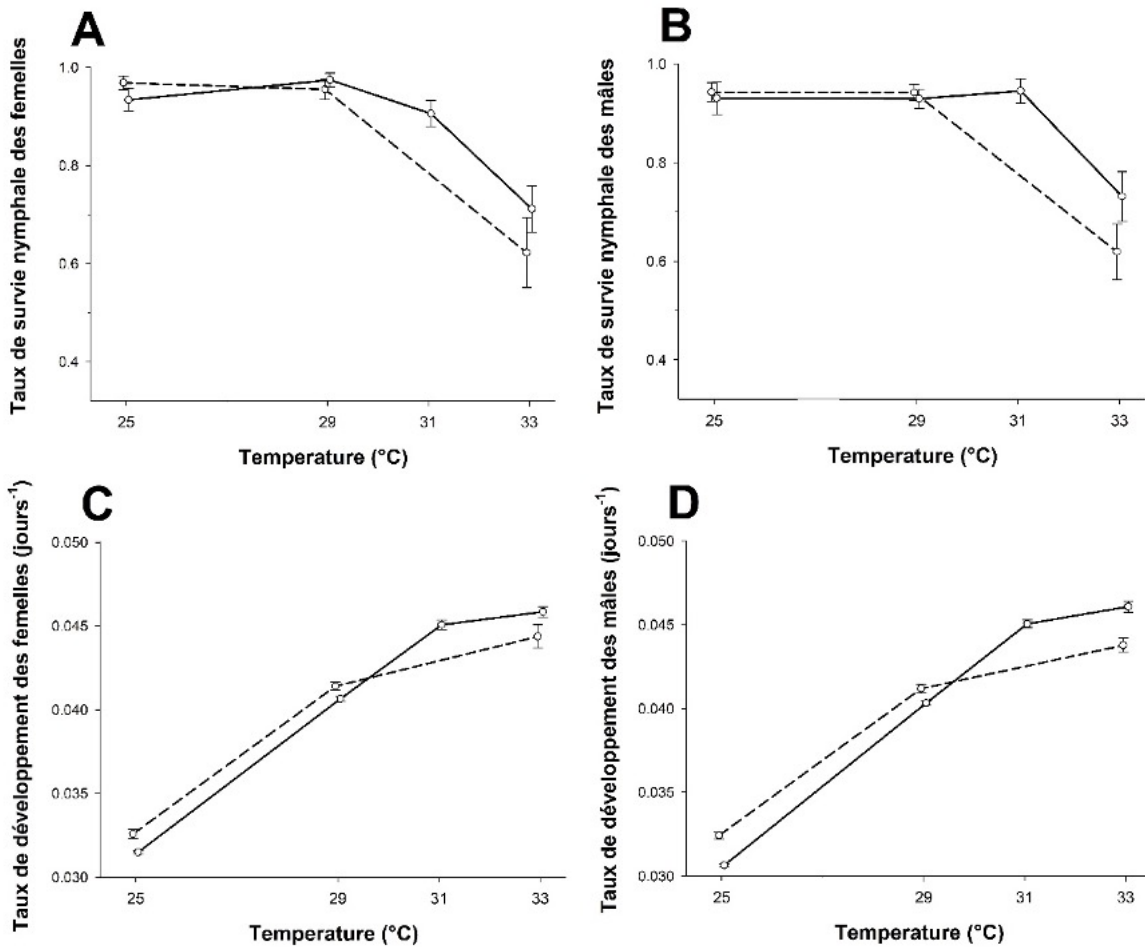
**Taux d'éclosion, survies larvaires précoce et tardive** (Figure 19) - Le taux d'éclosion a été dans l'ensemble meilleur sur cette série expérimentale que sur la précédente. Malgré cela, l'effet de la température a été similaire avec une faible variation entre 25 et 29°C et un succès d'éclosion moins important à 33°C. La température de 31°C a généré un taux d'éclosion intermédiaire entre 29 et 33°C, ce qui indique que 31°C n'est ni optimal ni très défavorable au succès d'éclosion. Les valeurs observées pour les survies larvaires précoce et tardive ont été un peu plus élevées que dans la précédente expérimentation mais ont varié de façon

similaire avec la température. La survie larvaire a été bonne à 25 et 29°C pour ensuite chuter à 33°C. Comme pour le taux d'éclosion, les survies larvaires précoce et tardive à 31°C ont été intermédiaires entre 29 et 33°C, donc ni optimales ni très défavorables aux larves. Pour ces 3 paramètres liés à la survie des jeunes stades, le profil de performance thermique a donc été comparable, avec des températures favorables pour 25 et 29°C, une température un peu moins favorable à 31°C et une température très défavorable à 33°C.



**FIGURE 19.** Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) sur la mortalité des œufs et des larves. La série en tiretés correspond aux estimations obtenues avec le régime thermique fluctuant dans l'expérimentation du chapitre V<sub>A</sub>. **A** : Taux d'éclosion ( $N = 44, 55, 45$  et  $54$  parties de pontes pour les températures de  $25, 29, 31$  et  $33^\circ\text{C}$ ), **B** : taux de survie larvaire précoce entre les stades larvaires 1 et 4 ( $N$  identiques à ceux du taux d'éclosion), **C** : taux de survie larvaire tardif entre le stade larvaire 4 et le stade chrysalide ( $N = 315, 345, 345$  et  $300$  larves issues de 31 pontes respectivement pour les températures de  $25, 29, 31$  et  $33^\circ\text{C}$ ). Les barres verticales sont les erreurs standards à la moyenne entre les pontes.

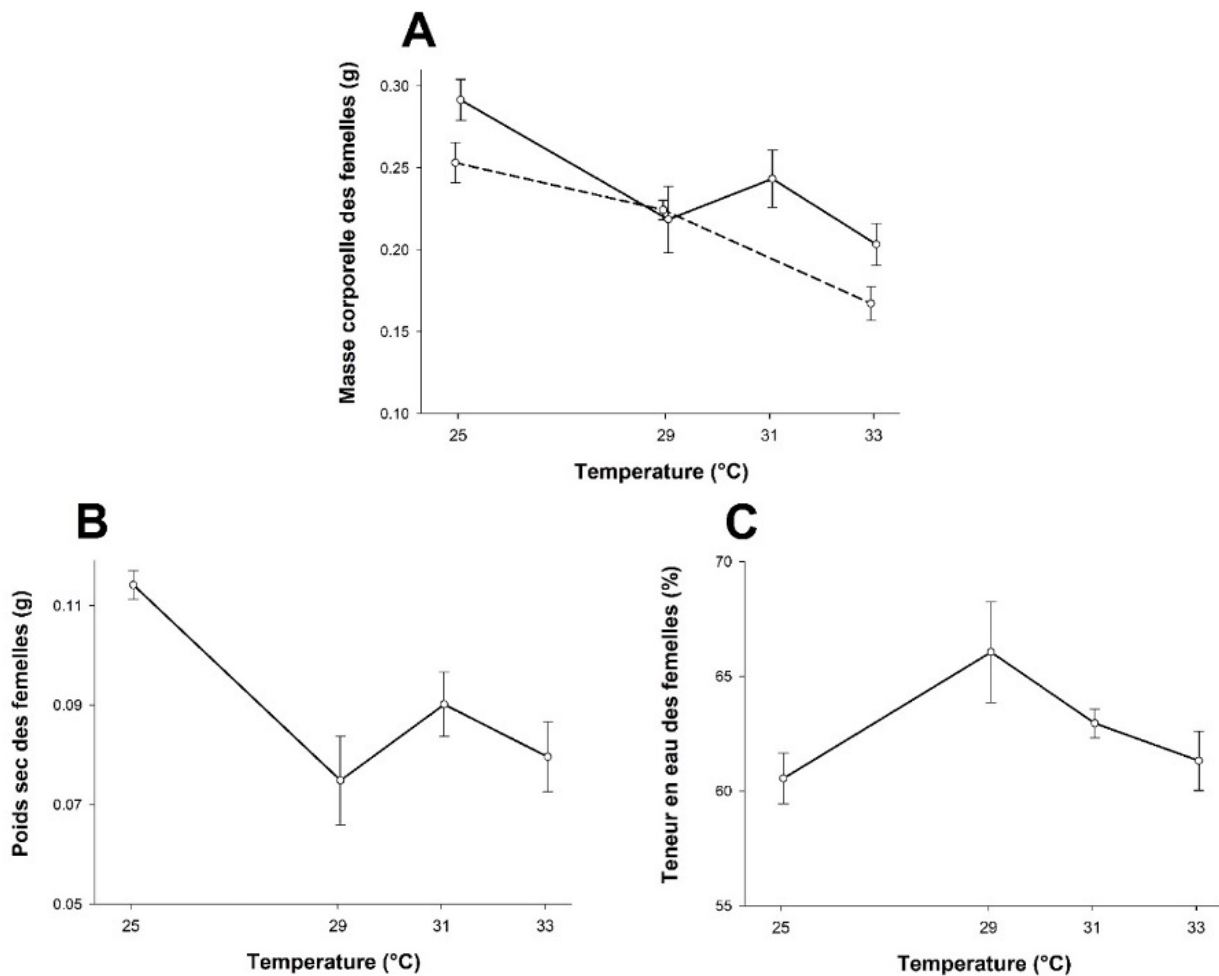
**Survie nymphale et taux de développement** (Figure 20) - Pour les températures de 25 et 29°C, on peut voir que les estimations des survies nymphales des mâles et des femelles, tout comme pour leur taux de développement, ont été similaires entre mes deux expérimentations. Comme pour les trois paramètres liés à la survie des jeunes stades, les valeurs à 33°C ont été un peu plus élevées dans la nouvelle expérimentation.



**FIGURE 20.** Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) sur la survie nymphale et la durée de développement. La série en tiretés correspond aux estimations obtenues avec le régime thermique fluctuant dans l'expérimentation du chapitre VA. **A:** Taux de survie nymphale des femelles ( $N = 136, 157, 138$  et  $104$  chrysalides pour les températures de  $25, 29, 31$  et  $33^\circ\text{C}$ ), **B:** taux de survie nymphale des mâles ( $N = 144, 170, 164$  et  $93$  chrysalides pour les températures de  $25, 29, 31$  et  $33^\circ\text{C}$ ), **C:** taux de développement des femelles entre le stade œuf et l'émergence ( $N = 127, 153, 125$  et  $74$  chrysalides pour les températures de  $25, 29, 31$  et  $33^\circ\text{C}$ ), **D:** taux de développement des mâles entre le stade œuf et l'émergence ( $N = 134, 158, 155$  et  $68$  respectivement pour les températures de  $25, 29, 31$  et  $33^\circ\text{C}$ ). Les barres verticales sont les erreurs standards à la moyenne entre les pontes.

Toutefois, les effets de la température ont encore été comparables entre les deux expérimentations. La survie des chrysalides a été maximale aux températures de 25 et 29°C (Figures 2A et B) et a chuté à 33°C. A 31°C, on peut constater que la survie nymphale est restée très élevée et qu'elle n'a donc pas posé de problème particulier pour la métamorphose des mâles et femelles. Concernant les taux de développement (Figures 2C et D), leur augmentation a été importante de 25 et 29°C, tout comme entre 29 et 31°C (pentes des relations inchangées de 25 à 31°C), mais elle a été beaucoup plus modeste entre 31 et 33°C. On peut donc considérer que les températures de 31 et 33°C permettent aux mâles et femelles de *S. littoralis* d'avoir un développement extrêmement rapide, un avantage souvent déterminant pour leur valeur sélective car ça peut permettre à l'espèce de bénéficier d'une génération supplémentaire lors d'années chaudes (Altermatt, 2010).

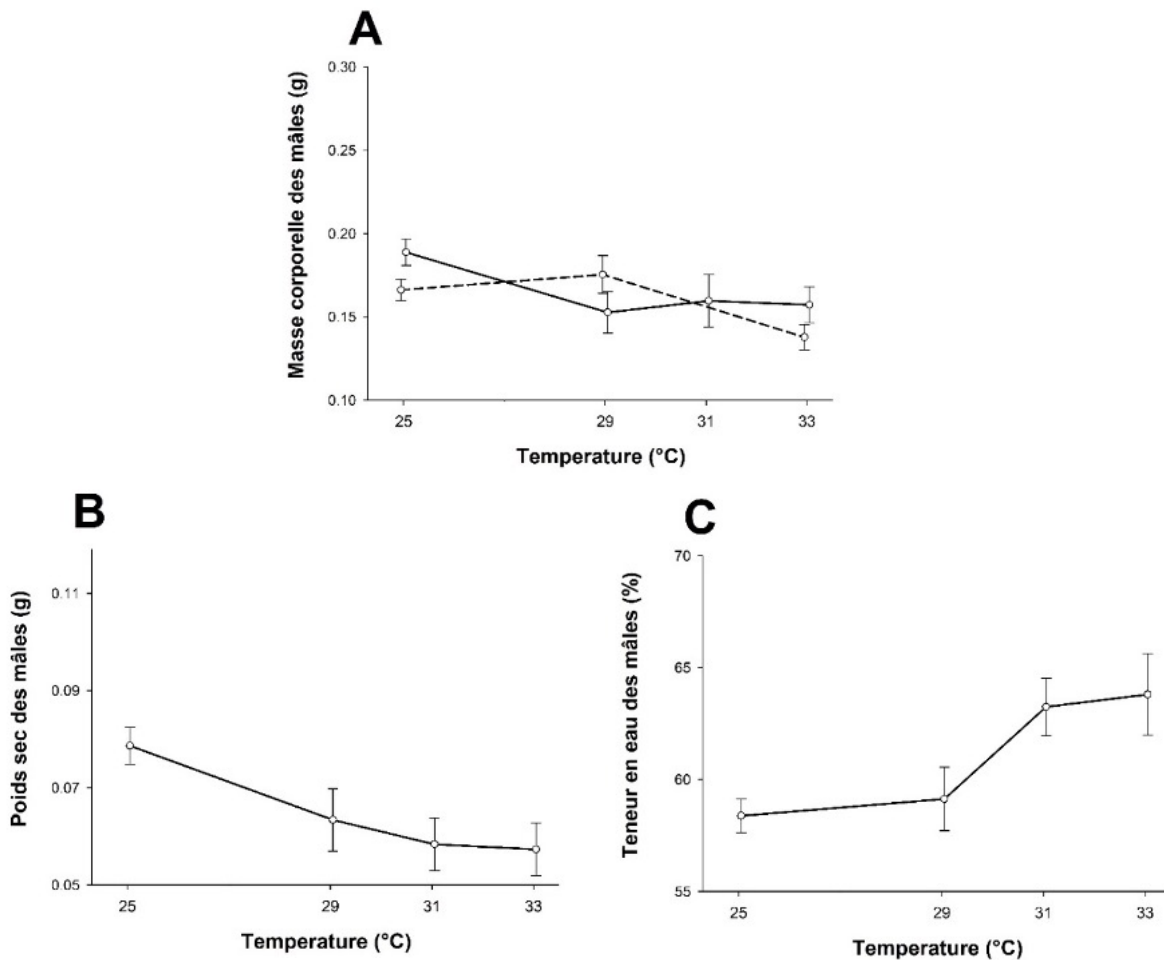
**Etat hydrique des femelles adultes** (Figure 21) - On observe une diminution de la masse corporelle des femelles adultes avec la température de développement (Figure 21A) comme cela avait été vu sur la masse corporelle des chrysalides femelles dans les deux études précédentes avec des températures constantes (Bagni et al. 2022 et Massot et al. 2021 dans le chapitre IV). Il faut noter les petites tailles d'échantillons (9, 6, 9 et 9 pour les températures de 25, 29, 31 et 33°C) et notamment celle de seulement 6 femelles à 29°C pour l'estimation de la masse corporelle, du poids sec et de la teneur en eau. Compte tenu également de l'importance des intervalles d'erreur, il serait risqué d'interpréter les estimations atypiques des femelles à 29°C (Figure 21). Ce que l'on peut le plus raisonnablement conclure au vu des résultats, c'est que la masse corporelle des femelles adultes a négativement été affectée par la température de développement ( $P=0,002$  dans le tableau 1) et que la réduction de leur masse sèche a été suffisante pour l'expliquer ( $P<0,001$  dans le tableau 1). Si une influence de la température semble avoir été détectée sur la teneur en eau des femelles, mais avec un test tout juste significatif ( $P=0,040$  dans le tableau 1), on peut émettre l'hypothèse que les femelles à 29°C peuvent s'être distinguées de celles à 25, 31 et 33°C. La fragilité de cette observation qui suggère une teneur en eau maximale pour la température très favorable de 29°C fait que cela sera à vérifier dans une future expérimentation.



**FIGURE 21.** Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sur la masse corporelle et la teneur en eau des femelles adultes. La série en tiretés correspond aux estimations obtenues avec le régime thermique fluctuant dans l'expérimentation du chapitre V<sub>A</sub>. **A:** Masse corporelle, **B:** poids sec, **C:** pourcentage de teneur en eau. Les barres verticales sont les erreurs standards à la moyenne. Les  $N$  pour les trois mesures ont été de 9, 6, 9 et 9 respectivement pour les températures de 25, 29, 31 et  $33^{\circ}\text{C}$ .

**Etat hydrique des mâles adultes** (Figure 22) - Comme pour les femelles, les résultats sur les mâles adultes reposent sur des tailles d'échantillon assez faibles (10, 10, 13 et 7 pour les températures de 25, 29, 31 et  $33^{\circ}\text{C}$ ), ce qui demandera de compléter cette étude par une autre expérimentation. On peut ainsi douter du fait que la masse corporelle des mâles n'ait pas été impactée par la température de développement ( $P=0,174$  dans le Tableau 1) alors que leur masse sèche a été négativement influencée par la température (Figure 22B, Tableau 1) et que deux expérimentations précédentes ont aussi montré un effet négatif de la température sur la masse corporelle des chrysalides mâles (Bagni et al. 2022 et Massot et al.

2021 dans le chapitre IV). Même s'ils doivent être confirmés dans une future étude, les résultats sur la masse sèche et la teneur en eau des mâles adultes semblent tout à fait intéressants et pourraient même expliquer l'absence de relation entre température et masse corporelle. En effet, la masse sèche des mâles a été négativement influencée par la température (Figure 22B,  $P=0,035$  dans le tableau 1) alors que la teneur en eau l'a été positivement (Figure 22C,  $P=0,011$  dans le tableau 1). Ces deux relations se contrebalancent pour un effet de la température sur la masse corporelle des mâles. L'hypothèse qui se dégage, et qui devra être confirmée ultérieurement, est que les mâles adultes qui se développent à des températures élevées ont à la fois une faible masse sèche et une importante teneur en eau.



**FIGURE 22.** Influence de la température journalière fluctuante ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sur la masse corporelle et la teneur en eau des mâles adultes. La série en tiretés correspond aux estimations obtenues avec le régime thermique fluctuant dans l'expérimentation du chapitre V<sub>A</sub>. **A:** Masse corporelle, **B:** poids sec, **C:** pourcentage de teneur en eau. Les barres verticales sont les erreurs standards à la moyenne. Les  $N$  pour les trois mesures ont été de 10, 10, 13 et 7 respectivement pour les températures de 25, 29, 31 et 33°C.



## Discussion

L'expérimentation présentée ici avait pour buts d'étudier les réponses à la température intermédiaire de 31°C, de conforter les estimations obtenues dans la première expérimentation sur les températures fluctuantes (partie VA) et d'initier une étude de l'influence de la température de développement sur l'état hydrique des adultes. Comme discuté ci-après, les différents résultats de l'expérimentation ont assez bien répondu à ces trois objectifs.

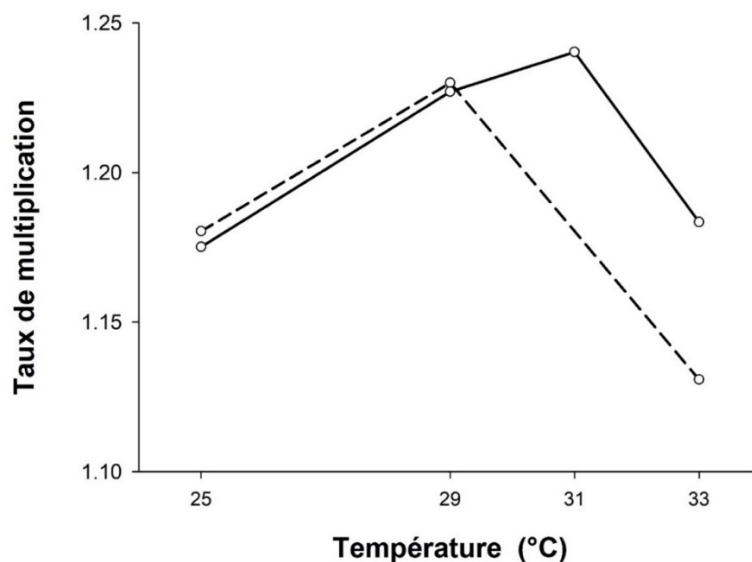
### Effet du développement à 31°C et robustesse des effets aux autres températures

Le premier enseignement de l'étude est que la robustesse des effets des températures fluctuantes aux températures de 25, 29 et 33°C a été bien confortée par les nouvelles estimations (comparaison des nouvelles estimations à celles de la partie V<sub>A</sub> dans les figures 19 et 20). Ceci vaut pour l'effet négatif de la température de 33°C sur le taux d'éclosion, les survies larvaires précoce et tardive, ainsi que sur la survie nymphale des mâles et des femelles. Ceci vaut aussi pour la relation positive entre la température et le taux de développement des mâles et femelles. Une différence quand même observée entre les deux études est que l'effet négatif de la température de 33°C a été un peu moindre dans la nouvelle étude (figures 19 et 20), ce qui pourrait souligner la grande sensibilité de *S. littoralis* dans la zone thermique proche de sa limite supérieure.

Les études des parties IV<sub>A</sub>, IV<sub>B</sub> et V<sub>A</sub> ont montré que la température optimale de *S. littoralis* était proche de 29°C pour l'essentiel de ces paramètres et que sa limite maximale de tolérance était proche de 33°C, en dehors de son taux de développement qui était maximal à 33°C. Il était important de préciser les réponses de l'espèce dans cette plage critique des températures élevées où les paramètres peuvent énormément varier (Colinet et al. 2015; Martin & Huey 2008; Paaijmans et al. 2013; Stoks et al. 2017). Avec cette nouvelle étude, j'ai pu confirmer que tous les paramètres de *S. littoralis* n'avaient pas la même température optimale et préciser les différents optima avec les nouvelles observations à 31°C. Au final, les températures fluctuantes ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) de 25 et 29°C sont associées aux valeurs maximales du taux d'éclosion (Figure 19A), des survies larvaires précoce et tardive (Figures 19B et C), ainsi que de la survie nymphale des femelles (Figure 20A). Pour la survie nymphale des mâles, la plage optimale de température semble un peu plus étendue et aller jusque 31°C (Figure

20B). La différence entre mâles et femelles n'est quand même pas si flagrante car la diminution de survie nymphale des femelles est restée assez limitée entre 29 et 31°C. En ce qui concerne le taux de développement, son optimum a été confirmé à 33°C, à la fois pour les mâles et les femelles (Figures 20C et D). Il faut quand même aussi préciser que les taux de développement à 31°C ont été très élevés et proches de ceux à 33°C, et avec une accélération toujours notable du développement entre 29 et 31°C (Figures 20C et D).

Globalement, on voit donc que les températures de 31 et 33°C permettent à *S. littoralis* d'avoir un développement extrêmement rapide, ce qui peut lui conférer un important avantage de valeur sélective si ça lui permet d'avoir une génération supplémentaire lors d'années chaudes (Altermatt, 2010). Les coûts des autres paramètres de valeur sélective pour la température de 33°C (chute du taux d'éclosion, des survies larvaires précoce et tardive et de la survie nymphale) font que l'on peut s'attendre à ce que 31°C soit au final la température la plus optimale pour la valeur sélective globale de *S. littoralis*, à tout le moins pour la fluctuation journalière étudiée de  $\pm 5^\circ\text{C}$  qui correspond à une valeur très commune dans les milieux naturels (Wang & Dillon 2014). C'est en effet ce qui a émergé de l'estimation des taux de multiplication présentés dans la figure 23.



**FIGURE 23.** Influence de la température journalière fluctuante sur le taux de multiplication. La série en tirets correspond aux estimations obtenues avec le régime thermique fluctuant dans l'expérimentation du chapitre V<sub>A</sub>. Les taux de multiplication ont été estimés par la modélisation du cycle de vie de *S. littoralis* et son paramétrage par les valeurs obtenues sur l'ensemble des paramètres de valeur sélective (valeurs des figures 19 et 20).

Ceci précise la précédente inférence sur la température optimale qui la situait proche de 29°C sans avoir la connaissance des températures comprises entre 29 et 33°C (Figure 23). Une autre observation que l'on peut faire est qu'il y a eu une variabilité notable des taux de multiplication entre mes deux séries expérimentales pour la température de 33°C. En parallèle, il est à noter que les taux de multiplication des deux séries expérimentales ont été très similaires pour les températures à 25 et 29°C. On peut raisonnablement penser que la variabilité uniquement trouvée à 33°C souligne la grande sensibilité de *S. littoralis* dans la zone thermique proche de sa limite supérieure.

### **Etat hydrique des adultes**

La loi d'Atkinson (souvent appelée 'temperature-size rule') rend compte d'une relation très classique chez les ectothermes avec une diminution de la taille (ou de masse) corporelle des individus avec une augmentation de la température de développement (Atkinson 1994). J'ai observé cette relation dans mes précédents travaux sur la masse corporelle des chrysalides soumis à des températures constantes (Bagni et al. 2022 et Massot et al. 2021 dans le chapitre IV). Dans mes résultats avec les températures fluctuantes, j'ai aussi observé cette relation sur la masse corporelle et la masse sèche des femelles (Figure 21), mais uniquement sur la masse sèche des mâles. La masse sèche des mâles a été négativement influencée par la température alors que leur teneur en eau l'a été positivement (Figure 22). Ces deux relations conjointes qui ont conduit les mâles des températures élevées à avoir une faible masse sèche et une importante teneur en eau a abouti à une absence de relation entre la masse corporelle des mâles et la température. Cette hypothèse où l'influence de la température sur la masse sèche est contrebalancée par celle sur la teneur en eau sera à confirmer dans une expérimentation future pour pallier à la faiblesse d'échantillonnage de mon jeu de données. A tout le moins, cette première étude sur l'état hydrique des adultes a montré tout l'intérêt de cette ligne de recherche. Ce sera peut-être aussi une entrée pour étudier un dimorphisme sexuel sur la réponse physiologique de *S. littoralis* à un stress thermique.

Le résultat qui interpelle le plus est la teneur plus élevée en eau chez les mâles adultes qui se sont développés à 31 et 33°C quand on la compare avec celle des mâles de 25 et 29°C

(Figure 22C). Comment expliquer cette augmentation de la teneur en eau pour des températures élevées ? Ce que nous pouvions *a priori* attendre d'une relation directe entre température et état hydrique des individus était plutôt davantage de pertes en eau avec une augmentation de température. D'un point de vue physiologique, les effets indirects des températures élevées sur la teneur en eau des mâles pourraient soit indiquer un dérèglement physiologique lié à un stress thermique, soit à l'opposé une régulation du taux hydrique des mâles pour mieux résister aux températures élevées. D'un point de vue des conditions physiques, il est aussi possible qu'il y ait eu une plus grande disponibilité en eau avec les températures élevées car j'ai en effet observé avec celles-ci qu'il y avait davantage de condensation sur les parois des boîtes expérimentales. Comme dans un air plus chaud l'humidité relative est maintenue à une valeur fixe (70% dans mes études) au moyen d'une humidité absolue plus élevée, je pense que la condensation plus importante était due à une vaporisation d'eau plus importante dans mes chambres climatiques. Toutefois, cette hypothèse d'une plus grande disponibilité en eau avec les températures élevées impliquerait que l'eau ait été une ressource limitante pour les mâles, ce qui est peu crédible pour les conditions expérimentales qui étaient fixées avec une humidité relative de 70%. De plus, il me semble alors difficile d'expliquer pourquoi les mâles aux températures moins élevées aurait eu une teneur en eau moins élevée. Une autre question se pose sur la différence entre mâles et femelles. S'il a bien été observé un effet significatif de la température de développement sur la teneur en eau des deux sexes (Tableau 1), la teneur en eau maximale (proche de 65% chez les deux sexes) a été observée à 31 et 33°C chez les mâles et à seulement 29°C chez les femelles (Figures 21 et 22). Ce résultat sera à confirmer dans une future étude car il ne repose que sur 6 femelles pesées pour le lot à 29°C.

L'effet de la température de développement sur l'état hydrique n'est pas simple et cette étude soulève de nouvelles questions. La réponse principale qu'elle donne est quand même importante car l'étude a montré que l'état hydrique des individus a été sensible à la température de développement et d'une manière qui semble passer par une régulation ou dérégulation physiologique. On peut voir tout l'intérêt qu'auraient de futurs travaux où des mesures physiologiques liées à la régulation hydrique et au stress seraient faites dans une

expérimentation croisant différentes conditions thermiques avec différentes conditions hydriques (par exemple, 70% *versus* 40% *versus* 20%).

## C. Effet de l'amplitude de variation journalière de la température sur la sensibilité aux insecticides

Cette étude s'intéresse aux effets de l'amplitude de la fluctuation thermique sur la sensibilité de larves de *S. littoralis* à la deltaméthrine et au chlorpyrifos, avec des températures expérimentales appliquées du stade œuf au stade larvaire L4 (Figure 11 du chapitre III). A l'effet de l'augmentation moyenne de la température sur la sensibilité aux insecticides (Hooper et al. 2013; Noyes et al. 2009), il pourrait s'ajouter un effet de l'amplitude des fluctuations journalières. Les quelques résultats connus sur l'effet de la fluctuation de température vont dans ce sens (Delnat et al. 2019 ; Verheyen et al. 2019). Ce point est d'ailleurs d'autant plus sensible qu'il a été montré une augmentation de l'amplitude des fluctuations journalières en parallèle du réchauffement climatique (Wang & Dillon 2014). Dans l'expérimentation présentées ci-après, les effets des insecticides chlorpyrifos et deltaméthrine sur des larves L4 ont été comparés entre trois régimes de fluctuations journalières différents : un régime constant, un régime avec une fluctuation journalière de 5°C ( $\pm 2,5^\circ\text{C}$  autour de la moyenne) et un régime avec une fluctuation journalière de 10°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$  autour de la moyenne), ce dernier étant comparable à la fluctuation étudiée dans la partie V<sub>A</sub>. Cette comparaison des trois régimes de fluctuations a été faite pour deux températures moyennes, 25 et 33°C. Le manuscrit présenté ci-après va être soumis prochainement.

# Daily temperature fluctuation interacts with mean temperature to increase insecticide toxicity on a pest moth

Thibaut Bagni, Mélissa Bouanou, David Siaussat, Annick Maria, Annabelle Fuentes, Philippe Couzi, and Manuel Massot

Sorbonne Université, CNRS, INRAe, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, iEES-Paris, F-75005, Paris, France

## ABSTRACT

Ecotoxicology studies are challenged by the current climate change that associates an increase of daily temperature fluctuation to the rising of mean temperature. Classically illustrated by the effect of laboratory constant temperatures on the species responses to pesticides, this challenge was recently reinforced by a review revealing that toxicity of pesticides is often increased by daily temperature fluctuation. Here, we investigated the combined effects of daily temperature fluctuation and mean temperature on toxicity of two insecticides in the pest *Spodoptera littoralis*. Our study tested the toxicity of chlorpyrifos and deltamethrin on larvae reared at mean temperature of 25 or 33°C and daily temperature fluctuation of 5 or 10°C. We showed that daily temperature fluctuation increased larval mortality induced by chlorpyrifos and deltamethrin. Remarkably, the increase of deltamethrin toxicity by daily temperature fluctuation was dependent on the combined effects of the amplitude of daily fluctuation and mean temperature. This increase of deltamethrin toxicity occurred with a daily fluctuation of only 5°C for larvae reared at 25°C and a daily fluctuation of 10°C in larvae reared at 33°C. In order to confidently quantify the responses of insecticide toxicity to temperature, future ecotoxicology studies will have to evaluate the generality of this interaction between the effects of daily temperature fluctuation and mean temperature. This new research avenue might help to optimise the pest control strategies to face the global increase of temperature and daily temperature fluctuation.

**KEYWORDS:** fluctuating temperature, daily variation, pesticide, insect, mortality, *Spodoptera littoralis*

## INTRODUCTION

Temperature influences almost all the characteristics of ectotherms (Angilletta, 2009). In particular, the influence of temperature on metabolic and population growth rates of pest insects is predicted to result in an increase of crop production losses with climate warming (Deutsch et al., 2018). It is afraid that an increase of insecticide use will follow and lead to a threatening cocktail of warmer temperatures, more destructive pest insects and unwanted high use of insecticides. This will be a complex cocktail because temperature and insecticides are interactive factors (Hooper et al., 2013). Various causes can lead temperature to increase or decrease insecticides toxicity. Rising temperature increases the uptake and excretion of insecticides (Hooper et al., 2013), should increase the activity of detoxification enzymes (Angilletta, 2009; Massot et al., 2021), can affect the biotransformation of insecticides (Hooper et al., 2013), and might even influence evolution of species resistance to insecticides (Fournier-Level et al., 2016). The effect of temperature on insecticides toxicity depends also on chemical class of insecticides (Hooper et al., 2013). Rising temperature usually increases toxicity of organophosphorus insecticides, decreases toxicity of type 1 pyrethroids, and the two opposite effects are observed for type 2 pyrethroids (Hooper et al., 2013). These variations are explained by different biotransformation processes (Hooper et al., 2013; Lydy et al., 1999).

In parallel with the effects of rising temperatures, a recent review showed that insecticides toxicity is also influenced by the daily temperature fluctuation (DTF) (Verheyen et al., 2022). Compared to constant experimental temperatures, DTF increases insecticides toxicity in most of studies of the review. Specifically for the three insect species documented in this review (the mosquito *Culex pipiens*, the midge *Chironomus dilutes*, and the damselfly *Ischnura elegans*), DTF increased the mortality caused by insecticides in 10 out of 14 tests. This influence of DTF on insecticides toxicity cannot be ignored because most species face daily variation in temperature (Sheldon and Dillon, 2016). Crucially, taking into account DTF should become still more pregnant in the future because a rising of DTF is associated with climate change. DTF increased of 1.0°C in temperate regions and



0.3°C in tropical regions during the 1975-2013 period (Wang and Dillon, 2014). This global change of DTF is expected to have a synergistic effect with the rising of mean temperatures, particularly with detrimental effects on temperate ectothermic invertebrates (Vasseur et al., 2014).

We studied the influence of DTF, and of its magnitude, on insecticides toxicity in the moth *Spodoptera littoralis*. This highly polyphagous species is a major crop pest widespread in Africa and Mediterranean region (CABI, 2020). The species richness of Mediterranean moths was showed to respond to temperature (Uhl et al., 2022). We tested DTF influence on toxicity of two insecticides, chlorpyrifos and deltamethrin, in which interactions between insecticides and temperature were already showed in *S. littoralis* (Bagni et al., 2022; Massot et al., 2021). The toxicity of these insecticides was appraised from mortality of larvae reared under mean temperatures of 25 and 33°C, 25°C being a favourable temperature for the species and 33°C being close to the maximal temperature supported by the species (Bagni et al., 2022; Massot et al., 2021). We chose to study these two relatively high temperatures because insects will be more frequently challenged by high temperatures with climate warming (Kearney et al., 2009) and ectotherms are particularly sensitive to high temperatures (Colinet et al., 2015; Martin and Huey, 2008; Paaijmans et al., 2013; Stoks et al., 2017). We tested the effect of DTF by comparing developmental temperatures with daily fluctuation of 5 and 10°C. The daily fluctuation of 10°C is common in natural environments (Wang and Dillon, 2014) and the most commonly used in studies on fluctuating thermal regimes (Verheyen et al., 2022).

## MATERIALS AND METHODS

### Insects

The cotton leafworm *S. littoralis* is an African Noctuid pest that expanded in southern Europe and Asia, with larvae that attack a wide variety of crops (CABI, 2020). Experimental animals were obtained from a laboratory strain reared on a semiartificial food (Hinks and

Byers, 1976) at 23°C, 70 % relative humidity, and 16:8 light/dark cycle. We obtained experimental clutches from mating one male and one female at 23°C for 24h in plastic boxes (10 cm of diameter) with sugar water (20g/L) as food source. We performed the study from 67 clutches that we collected between the 8<sup>th</sup> of July and 18<sup>th</sup> of August 2021.

### **Experimental setup**

Each clutch was randomly assigned to a mean developmental temperature of 25 or 33°C and a DTF group with 5 or 10°C (*i.e.*,  $\pm 2,5$  or 5°C around mean temperature). We used environmental test chambers (Panasonic MLR-352H, France) to control temperatures independently of relative humidity (fixed to 70 %). We applied these thermal conditions from the egg stage to the fourth larval instar when larvae were treated with insecticides or control solutions. Forty-five larvae were collected from each experimental clutch at the fourth larval instar and separated into three batches of 15 larvae treated with one of the three treatments: a control, chlorpyrifos or deltamethrin treatment. Immediately after treatment, larvae were put back in their thermal condition for 72 hours, and larval survival was then quantified.

### **Insecticides**

Deltamethrin and chlorpyrifos concentrations were chosen according to previous studies (Bagni et al., 2022, 2020; Massot et al., 2021). We used concentrations of 0.76 mg/L for deltamethrin (45423, Sigma Pestanal, France) and 44 mg/L for chlorpyrifos (45395, Sigma Pestanal, France), which have shown intermediate toxicity at constant temperatures. Initial solutions were prepared in ethanol and diluted in hexane before treatment. Control solution was prepared with 15 % ethanol and 85 % hexane. We used hexane because deltamethrin and chlorpyrifos has a low solubility in ethanol. Hexane has the advantage to quickly dissipates in insecticide treatments with topical application. Treatment solution of 0.5  $\mu$ L were deposited on the larvae antenna with a Hamilton 25  $\mu$ L syringe and a Hamilton dispenser, corresponding to a dose of 0.38 ng of deltamethrin or 22 ng of chlorpyrifos on each larva.

## Statistical analyses

Larval survival was analysed with logistic models. Overall analyses tested the effects of the insecticide treatments, mean developmental temperature, temperature fluctuation DTF, and their interaction. For the test of insecticide treatments, chlorpyrifos and deltamethrin treatments were compared separately to the control. We performed also specific analyses on deltamethrin, chlorpyrifos and control groups to examine more deeply the effects of mean temperature and DTF. Analyses were carried out with JMP software (JMP Pro 15, SAS Institute Inc., Cary, NC), using stepwise removal of terms with  $P > 0.10$ .

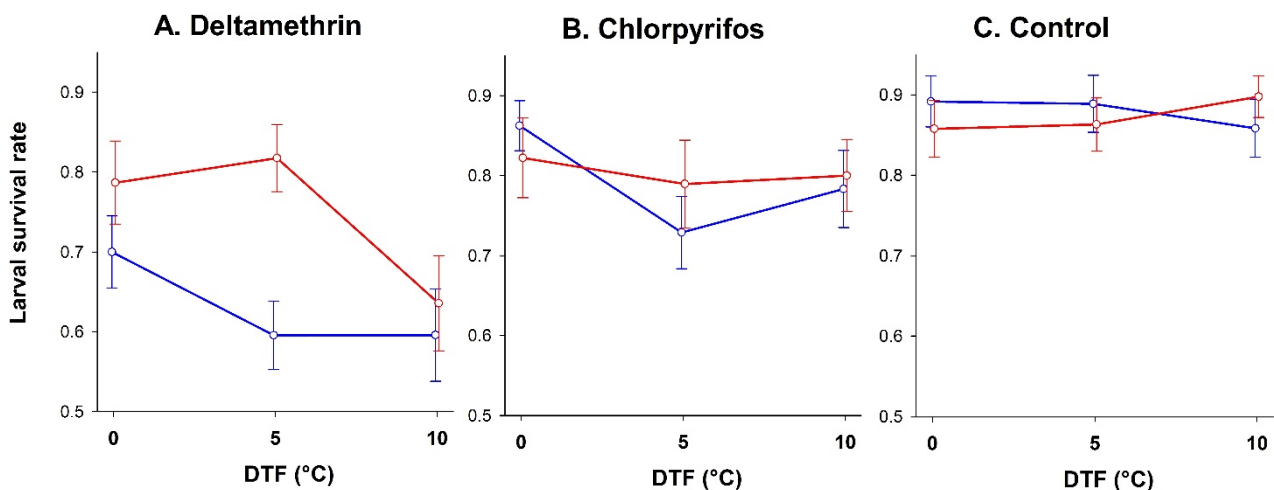
## RESULTS

Table 1 shows the overall analyses that tested the effects of the insecticide treatments, mean temperature and temperature fluctuation DTF. Compared to the control group, the insecticides chlorpyrifos and deltamethrin decreased larval survival rates ( $P < 0.001$ , Figure 1). Beyond this normal detrimental effect of insecticides, the results differed between chlorpyrifos and deltamethrin. If the effect of chlorpyrifos did not interact with mean temperature and DTF (Table 1), the effect of deltamethrin depended on the combined effects of mean temperature and DTF ( $P = 0.005$  for the interaction between the three factors). Detailed analyses of Table 2 confirmed that survival of larvae treated with deltamethrin depended on the interaction between mean temperature and DTF, with also significant average effects of mean temperature and DTF. Deltamethrin toxicity was increased in the colder temperature of 25°C as we expected, but it was also increased with a higher daily temperature fluctuation (Figure 1A). The interaction between mean temperature and DTF revealed that the increase of deltamethrin toxicity with DTF was for a smaller amplitude of DTF in the colder temperature of 25°C. The DTF effect on toxicity with larvae reared at 25°C was found for a daily fluctuation of only 5°C, while this effect in larvae reared at 33°C was found for a daily fluctuation of 10°C (Figure 1A). For larvae treated with chlorpyrifos, we found a significant DTF effect ( $P = 0.006$  in Table 2). Similarly to deltamethrin, chlorpyrifos

toxicity increased with a higher daily temperature fluctuation (Figure 1B) but without an interaction with mean temperature. For larvae of the control group, the mean temperature, DTF and their interaction were not significant (Table 2, Figure 1C).

**Table 1.** Tests of the response of larval survival rates to insecticide treatments, temperature, daily temperature fluctuation (DTF), and their interaction. Each insecticide, deltamethrin or chlorpyrifos, was compared to the control group. Significant *P*-values are in bold.

	Deltamethrin	Chlorpyrifos
Insecticide	$\chi^2_1=138.7$ <i>P</i> <0.001	$\chi^2_1=32.2$ <i>P</i> <0.001
Temperature	$\chi^2_1=6.7$ <i>P</i> =0.010	$\chi^2_1=0.1$ <i>P</i> =0.816
DTF	$\chi^2_2=5.8$ <i>P</i> =0.055	$\chi^2_2=6.0$ <i>P</i> =0.049
Insecticide x Temperature	$\chi^2_1=10.2$ <i>P</i> =0.001	$\chi^2_1=0.4$ <i>P</i> =0.543
Insecticide x DTF	$\chi^2_2=7.6$ <i>P</i> =0.023	$\chi^2_2=4.1$ <i>P</i> =0.130
Temperature x DTF	$\chi^2_2=2.2$ <i>P</i> =0.336	$\chi^2_2=4.5$ <i>P</i> =0.107
Insecticide x Temperature x DTF	$\chi^2_2=10.6$ <i>P</i> =0.005	$\chi^2_2=3.0$ <i>P</i> =0.229



**Figure 1.** Larval survival rates in function of the amplitude of daily temperature fluctuation (DTF), mean temperatures and insecticide treatments. Mean temperatures are 25°C in blue and 33°C in red. **A:** survival rate of larvae treated with deltamethrin, **B:** survival rate of larvae treated with chlorpyrifos, **C:** survival rate of larvae of the control group. Error bars are s.e.m.

**Table 2.** Tests of the response of larval survival rates to temperature and daily temperature fluctuation (DTF) for deltamethrin, chlorpyrifos and control groups. Significant *P*-values are in bold.

	Deltamethrin	Chlorpyrifos	Control
Temperature	$\chi^2_1=24.6$ <b><i>P</i>&lt;0.001</b>	$\chi^2_1=0.4$ <i>P</i> =0.520	$\chi^2_1=0.2$ <i>P</i> =0.674
DTF	$\chi^2_2=20.2$ <b><i>P</i>&lt;0.001</b>	$\chi^2_2=10.1$ <b><i>P</i>=0.006</b>	$\chi^2_2<0.1$ <i>P</i> =0.993
Temperature x DTF	$\chi^2_2=11.9$ <b><i>P</i>=0.003</b>	$\chi^2_2=3.7$ <i>P</i> =0.154	$\chi^2_2=3.5$ <i>P</i> =0.173

## DISCUSSION

The aim of the study was to test the influence of daily variation DTF on toxicity of two insecticides in the pest *S. littoralis*. Our results showed that DTF increased toxicity of the two insecticides. Remarkably, the DTF's increase toxicity of the insecticide deltamethrin was dependent on the combined effects of the DTF amplitude and developmental temperature (Table 2, Figure 1).

We tested two insecticides of different chemical classes, deltamethrin as a pyrethroid and chlorpyrifos as an organophosphorus insecticide. We expected deltamethrin and chlorpyrifos to respond differently to temperature. Deltamethrin was observed less toxic in *S. littoralis* under warmer developmental conditions (Massot et al., 2021; Riskallah, 1984) and chlorpyrifos is known to be more toxic at high temperature (Lydy et al., 1999; Meng et al., 2020; Tran et al., 2018) as also revealed in *S. littoralis* (Bagni et al., 2022). If we found well that larvae treated with deltamethrin had survival rates higher at 33 than 25°C, we did not find the expected effect of temperature in larvae treated with chlorpyrifos. The temperature effect might have ruled out by the significant DTF effect observed in larvae treated with chlorpyrifos (Table 2).

As we found for deltamethrin and chlorpyrifos, DTF was showed to increase the mortality induced by insecticides in 71% of the tests carried out on three insect species documented in a recent review (Verheyen et al., 2022). Most of these tests were on chlorpyrifos and DTF increased chlorpyrifos toxicity in 8 out of 11 tests (73% of tests). Our study provides additional evidence of this effect in a fourth insect species. A single test

found the opposite result of a decrease toxicity of chlorpyrifos with DTF (Delnat et al., 2021). This uncommon result was observed in the mosquito *Culex pipiens* and explained by a positive effect of DTF on the degradation rate of chlorpyrifos in the experimental environment rather than a less toxic effect on the species. The common DTF's increase of mortality was in fact found in *C. pipiens* larvae treated with chlorpyrifos in another study (Delnat et al., 2019). Very convincingly, all the 7 tests documented in the damselfly *Ischnura elegans* showed that DTF increased mortality induced by chlorpyrifos (Verheyen et al., 2022, 2019; Verheyen and Stoks, 2019a, 2019b). In the third insect of the review, the midge *Chironomus dilutes* that was tested with the pyrethroid Bifenthrin, it was also found the DTF's increase toxicity (Willming et al., 2013). Our study provides a second case of this DTF effect with a pyrethroid (main effect DTF for deltamethrin in Table 2) that lead to a clear decrease of survival under the two developmental temperatures tested (Figure 1).

In the context of the rising of DTF associated with climate change (Wang and Dillon, 2014), the toxicity increase of insecticides with DTF might almost appear as a good news to fight more efficiently and with lower insecticides doses against the pest insects, particularly because they are expected to cause more crop production losses with climate warming (Deutsch et al., 2018). Unfortunately, this is a bad news for the numerous non-target species that respond to low doses insecticides that persist or diffuse in the environment (Müller, 2018). In addition, daily thermal fluctuations are also expected to alter interspecific interactions, with already evidences of effects on competitive and host-pathogen/parasitoid interactions (Stoks et al., 2017). This complex picture is still reinforced by our unexpected finding of the significant interaction between temperature and DTF (Tables 1 and 2). This interaction revealed an effect of the DTF amplitude. In presence of the insecticide deltamethrin, a further decrease of larval survival was induced by a small DTF of 5°C at the colder temperature of 25°C. This decrease was induced by a larger DTF of 10°C at the hotter temperature of 33°C (Figure 1). A similar interaction between temperature and DTF was suggested in a recent study on the blue Mussel *Mytilus* (Vajedsamiei et al., 2021). Such an in-

teraction is a challenge for studies on DTF because it means that a result at a given temperature cannot be extrapolated confidently to another temperature. Ideally, future studies will have to investigate DTF effects on different temperatures.

To summarise, the overall effect of DTF observed with deltamethrin and chlorpyrifos was an increased toxicity of insecticides as generally found in previous studies (Verheyen et al., 2022). However, we showed here that this DTF influence can vary with the combined effects of mean developmental temperatures and DTF amplitude. The researches on DTF are still in infancy and more studies will be need to clarify this seemingly complex picture. As advised by Verheyen et al. (2022), it will be important to take into account daily thermal fluctuation in ecotoxicology studies. It will be particularly needed to investigate the effect amplitude of DTF that increases with the current climate change.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Région Ile-de-France (*Réseau de Recherche sur le Développement Soutenable*, DIM R2DS 2014).

## **REFERENCES**

Les références de ce manuscrit ont été intégrées aux références globales de la thèse et sont présentées en page 181.

## D. Synthèse

Face à la quasi universalité des fluctuations journalières de température que subissent les organismes, il est surprenant qu'elles restent ignorées par la grande majorité des études de biologie thermique. La raison en est sans doute la facilité expérimentale, voire le financement important qu'il faut investir pour acquérir des chambres climatiques programmables. Personnellement, je peux le comprendre car mes deux premières expérimentations présentées dans le chapitre IV ont été faites avec des températures constantes.

A température élevée (33°C), la survie larvaire, la vitesse de développement et le taux de multiplication de *S. littoralis* ont été plus faibles avec la fluctuation journalière de la température qu'avec une température constante. Une revue de la littérature chez les insectes a soutenu la généralité de ce constat d'une surestimation de la valeur sélective par l'emploi de températures constantes quand les températures d'étude sont élevées. Ainsi, il a été montré que le biais expérimental de travailler à température constante minimiserait les effets prédits du réchauffement climatique. L'étude de l'effet de la fluctuation thermique sur la toxicité des insecticides a confirmé la nécessité de travailler avec des températures fluctuantes. La fluctuation de température a en effet augmenté la toxicité des deux insecticides testés. L'amplitude de la fluctuation de température a également eu un impact sur la toxicité des insecticides.

En conclusion, je ne peux que recommander d'utiliser des régimes de température fluctuants dans les études de biologie thermique et d'écotoxicologie. La nécessité d'étudier les régimes de température fluctuants est d'autant plus grande face au constat d'une augmentation de l'amplitude des fluctuations journalières de température dans les différentes régions de la Terre (Wang et Dillon, 2014). Dans les futures études, l'ensemble des résultats de ce chapitre ont montré que le choix des températures moyennes et de leur amplitude de fluctuation journalière devait être murement réfléchi (informations sur l'espèce étudiée, réalisation de tests préliminaires).



## Chapitre VI. Effets de la température sur la communication chimique

Avec l'augmentation de la température et de la concentration de certains gaz atmosphériques, des perturbations de la communication chimique des espèces sont attendues comme effets du réchauffement climatique bien que leur étude reste encore très marginale (Boullis et al. 2016; Groot & Zizzari, 2019; Roggatz et al. 2022). Ces perturbations peuvent être critiques car la communication chimique est à la base de nombreux comportements vitaux. Elle permet par exemple aux mâles de nombreuses espèces de trouver des femelles grâce à la phéromone sexuelle émise par ces dernières. Les plantes libèrent aussi des molécules odorantes qui permettent aux femelles de se nourrir et de trouver des lieux de ponte favorables (notamment avec des sources de nourriture pour les futures chenilles) et aux mâles de se nourrir et de repérer des zones où les femelles seraient davantage présentes (Coracini et al. 2004; Rouyar et al. 2015).

La communication chimique possède plusieurs étapes clés, qui peuvent potentiellement, comme tout processus biologique, être impactées par le réchauffement climatique : la biosynthèse des molécules odorantes, leur émission, dispersion et détection, ainsi que les comportements qui peuvent en découler (activité, mobilité, reproduction) (Boullis et al. 2016; Roggatz et al. 2022). Mes travaux se sont intéressés à la potentielle modification de la détection olfactive suite à un développement sous deux différents régimes de température : un à 25°C avec une fluctuation journalière de 10°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$  autour de la moyenne) qui correspond à un domaine thermique optimal de *S. littoralis*, et l'autre à  $33 \pm 5^\circ\text{C}$  qui correspond à une température élevée proche de la limite thermique haute de l'espèce.

L'hypothèse principale testée dans mon étude est que la capacité à détecter des odeurs serait diminuée avec une température élevée défavorable en raison d'un développement non optimal du système neurosensoriel. Une autre hypothèse testée par mon étude est que la taille (ou la masse) corporelle des individus pourrait avoir un rôle à jouer dans cette réponse à la température. En effet, la taille des individus est négativement corrélée à la température de développement chez *S. littoralis* (Massot et al. 2021; Bagni et al. 2022) et

la majeure partie des ectothermes (Atkinson et al. 1994). Dans la mesure où les individus de plus petite taille sont souvent moins performants (Kingsolver et Huey 2008), on peut s'attendre à ce que la diminution de taille avec la température induise une diminution de la détection olfactive. Dans mon étude, j'ai mesuré et intégré la masse corporelle des individus dans les analyses afin de tester ce possible effet indirect de la température de développement sur la sensibilité olfactive.

## A. Étude de la détection olfactive des femelles

L'étude de la détection des odorants par les femelles qui se sont développées à 25 ou 33°C a été basée sur la technique d'électroantennographie (EAG). L'EAG permet de mesurer l'activité électrique d'une antenne entière, traduisant l'activité de récepteurs olfactifs en présence de molécules odorantes.

**Mesures EAG** - Pour mettre en œuvre l'EAG, les papillons sont mis en contention avec une électrode d'enregistrement placée au bout d'une antenne et une électrode de référence placée dans un œil, c'est-à-dire dans un tissu non olfactif. Les odorants testés ont été préparés chaque jour sur des morceaux de papier filtre placés dans des pipettes Pasteur. Les bouts de ces pipettes sont insérés dans un flux d'air constant et sont reliés à un système permettant de déclencher un pulse d'air au travers de la cartouche contenant un odorant à tester. Ceci permet d'envoyer des molécules odorantes dans un flux standardisé vers l'antenne du papillon. La dépolarisation électrique provoquée par la stimulation d'un odorant est amplifiée et enregistrée sur un ordinateur relié au système d'électroantennographie. Des éléments techniques plus détaillés sont donnés dans le chapitre III sur la méthodologie et dans le manuscrit sur l'étude EAG des mâles.

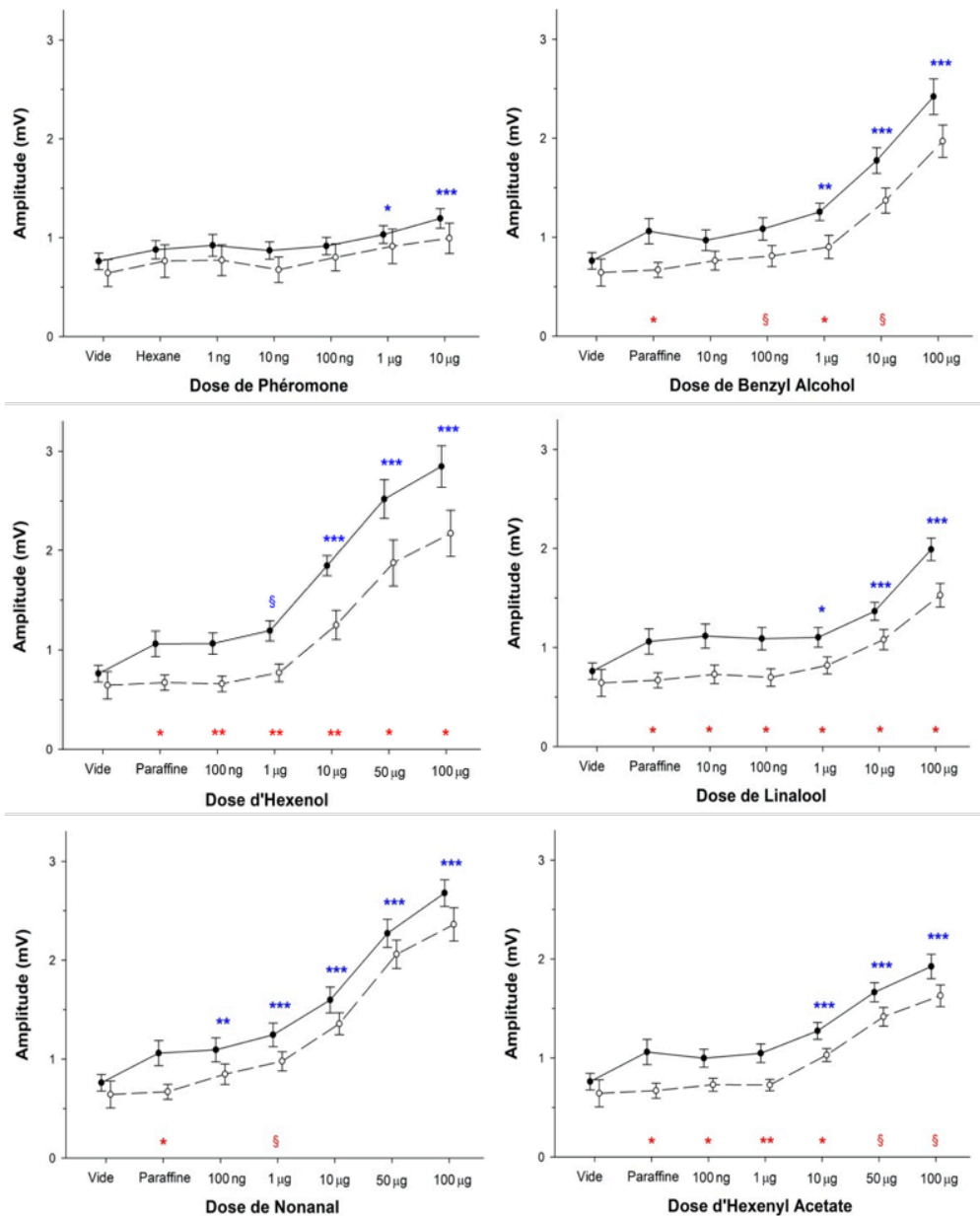
**Odorants étudiés** - Pour les odorants utilisés dans l'étude, je me suis intéressé à la détection des femelles pour la phéromone sexuelle et cinq odorants de plantes. La phéromone sexuelle de *S. littoralis* a été testée avec son composé majoritaire (Z,E)-9,11-14:OAc, composé qui est nécessaire et suffisant pour déclencher toutes les étapes du comportement sexuel du mâle (Quero et al. 1996). Les cinq odorants de plantes testés appartiennent à cinq familles chimiques différentes (benzyl alcohol, (±)-linalool, (Z)-3-hexenol, nonanal, (Z)3-

hexenyl acetate) et sont connues pour induire des réponses EAG chez *S. littoralis* (Martel et al., 2009; Saveer et al., 2012; Zakir et al., 2013). Chaque odorant de plantes a été dilué à cinq doses différentes dans un solvant d'huile de paraffine, et la phéromone a également été diluée à cinq doses différentes dans de l'hexane. Des mesures d'EAG ont été effectuées sur trois contrôles, un contrôle où la cartouche de stimulation EAG ne contenait que de l'huile de paraffine, un contrôle avec seulement de l'hexane et un contrôle ne contenant aucun solvant (contrôle dit 'Vide'). Chaque femelle testée a successivement été stimulée pour les contrôles, la phéromone et les odorants de plantes, et avec leurs doses testées dans leur ordre croissant pour la phéromone et les odorants de plantes. La séquence débutait par le contrôle 'Vide', puis par le contrôle hexane ou paraffine selon que les tests débutaient par la phéromone ou les odorants de plante (moitié des tests débutant par l'un ou l'autre). L'ordre a été aléatoire pour la séquence des stimulations entre les cinq odorants de plantes.

**Analyses statistiques** - Les tests statistiques ont été réalisés après une transformation logarithmique des valeurs obtenues lors des enregistrements EAG afin de satisfaire les hypothèses de normalité et d'égalité des variances. Pour comparer une même dose entre les deux températures de développement des femelles, j'ai utilisé des tests de Student, à l'exception des doses de 100 ng et 1 µg de phéromone où cela a été un test de Welch pour remédier à une non égalité des variances. Pour analyser l'effet des doses de chaque odorant sur la réponse EAG, et dans la mesure où il s'agissait de mesures non indépendantes sur chaque femelle testée, j'ai utilisé des tests de Student appariés pour comparer chaque dose d'odorant avec son contrôle (contrôle hexane pour une dose donnée de phéromone et contrôle paraffine pour une dose donnée d'un odorant de plante).

**Résultats et discussion** – L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure 24. La température de développement n'a pas significativement affecté la réponse des femelles à la phéromone. Par ailleurs, les femelles ont très peu répondu à la phéromone. Leur réponse a été significativement différente à celle du solvant hexane uniquement pour les deux doses les plus élevées de 1 et 10 µg. A titre de comparaison, les mâles ont répondu à la phéromone pour une dose minimale de 10 ng (Figure 1 du manuscrit de la partie VI<sub>B</sub>), c'est-à-dire pour

une dose 100 fois moindre. Ce résultat n'est pas surprenant quand on sait que la phéromone est produite par les femelles pour attirer les mâles.



**Figure 24** : Réponses mesurées par électroantennographie (EAG) chez les femelles *S. littoralis* pour la phéromone sexuelle et cinq odeurs de plantes. La figure montre les valeurs moyennes ( $\pm$  erreur standard à la moyenne) pour les températures de développement de 25°C (cercles pleins et ligne continue) et 33°C (cercles vides et ligne en tiretés). Les probabilités significatives ou marginalement significatives sont indiquées en rouge pour la comparaison des deux températures et en bleu pour la comparaison de chaque dose d'odorant avec son contrôle (Hexane pour la phéromone, Paraffine pour les odeurs de plantes) : §  $P < 0,10$ , \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . Les résultats des tests sur la comparaison des contrôles Hexane et Paraffine avec le contrôle Vide sans solvant sont indiqués dans le texte.

Les femelles ont répondu à toutes les odeurs de plantes pour des doses minimales variables selon les odorants (Figure 24). Les odorants testés provenant de plantes hôtes, ces réponses étaient attendues. De prime abord, le résultat qui semblait intéressant était la mise en évidence d'un effet significatif de la température sur la réponse EAG pour quatre des cinq odorants de plantes. Pour l'hexenol et le linalool, on observait cet effet de la température pour toutes les doses. Le résultat était très similaire pour l'hexenyl acetate mais avec seulement un effet marginalement significatif pour les deux doses les plus élevées. Cet effet était également observé significatif pour deux doses de benzyl alcool et marginalement significatif pour deux autres doses. Pour le nonanal, seule une tendance marginalement significative a été observé pour la dose assez faible de 1 µg. Les femelles ont donc semblé moins bien percevoir les odeurs de plantes après avoir fait leur développement à la température la plus élevée de 33°C (Figure 24). Cependant, nous ne pouvons pas conclure à cette différence de sensibilité de détection des odorants de plantes entre les femelles qui se sont développées à 25 et 33°C. En effet, cette différence semble avoir été uniquement due au solvant paraffine utilisé dans mes expérimentations comme en témoigne la différence entre les deux lots de température pour les mesures EAG sur le contrôle avec l'huile de paraffine (Figure 24).

Cette différence de réponse au solvant paraffine pourrait avoir traduit une activité électrique globale supérieure de l'antenne des femelles qui se sont développées à 25°C comparé aux femelles développées à 33°C. Toutefois, cette hypothèse ne peut être retenue car la différence d'EAG entre les deux lots de température n'a pas été observée dans le contrôle 'Vide' en l'absence du solvant paraffine (Figure 24;  $P > 0,10$ ) et la comparaison du contrôle Paraffine avec le contrôle Vide a montré une différence hautement significative à 25°C ( $F_{1\text{ vs }13\text{ ddl}} = 10,9$   $P = 0,006$ ). Ce problème lié à la paraffine n'a pas été observé à 33°C ( $F_{1\text{ vs }10\text{ ddl}} = 1,6$   $P = 0,241$ ). A noter qu'il n'y a pas eu de problème détecté pour le contrôle avec le solvant hexane (Figure 24 ;  $P > 0,10$  pour la différence entre 25 et 33°C ;  $F_{1\text{ vs }13\text{ ddl}} = 1,8$   $P = 0,200$  pour les femelles à 25°C et  $F_{1\text{ vs }10\text{ ddl}} = 0,1$   $P = 0,284$  pour les femelles à 33°C). Le problème spécifiquement lié au solvant paraffine semble même avoir expliqué l'ensemble des différences entre 25 et 33°C pour les réponses aux odeurs de plantes. L'ampleur du différentiel entre 25 et 33°C a en effet été conservé dans toutes les mesures aux différentes doses des

odorants, et ce même pour les faibles doses qui n'ont pas déclenché de réponse EAG significative des femelles (Figure 24). En raison de ce problème du contrôle Paraffine, je n'ai pas réalisé les analyses sur les effets liés à la masse corporelle des femelles.

**Comment expliquer l'effet lié au solvant paraffine ?** L'huile de paraffine que j'ai utilisé dans mes expérimentations a pu être contaminée par un odorant qui aurait provoqué une réponse supplémentaire à la réponse basale attendue. Cette odeur aurait eu un effet additif avec tous les odorants de plantes testés vu le différentiel relativement constant des mesures EAG observées entre 25 et 33°C, ce qui semble indiquer qu'aucune réponse aux odorants de plantes n'a différé entre les femelles développées à 25 et 33°C. Cependant, l'effet lié au solvant paraffine observé à 25°C amène une autre question : pourquoi la réponse EAG à cette possible contamination n'a pas été également observée chez les femelles à 33°C, et même chez les mâles, alors que les solutions d'huile de paraffine utilisées étaient les mêmes pour les deux sexes et les deux lots de température ? En effet, mes expérimentations sur les femelles et les mâles ont été réalisées en même temps et l'ordre de passage des individus testés a été aléatoire et indépendants du sexe et lot de température.

Pour la différence entre mâles et femelles, une possibilité est que le récepteur olfactif qui aurait réagi au contaminant chez les femelles n'est pas ou peu présent sur les antennes des mâles. Effectivement, les antennes des mâles et des femelles n'ont pas forcément les mêmes récepteurs ou la même quantité d'un récepteur donné. Cette différence entre sexes est par exemple connue pour la phéromone, ce qui amène une faible réponse EAG des femelles à la phéromone alors que les mâles y sont beaucoup plus sensibles, comme je l'ai d'ailleurs observé dans mes expérimentations (comparaison de la Figure 24 et de la Figure 1 du manuscrit de la partie VI<sub>B</sub>). Une différence de récepteur olfactif entre mâles et femelles a d'ailleurs été montré chez *S. littoralis* pour un récepteur phéromonal (OR5) qui est beaucoup plus exprimé chez les mâles que chez les femelles (Bastin-Héline et al. 2019).

Pour la différence entre les femelles qui se sont développées à 25 et 33°C, elle suggère qu'il y a tout de même eu une différence de capacité de détection du contaminant suspecté. Pour cet odorant contaminant, le ou les récepteurs impliqués pourraient avoir été moins sensibles ou moins nombreux après le développement des femelles à la température élevée

de 33°C. *In fine*, ceci témoignerait d'un effet de la température de développement sur la capacité de détection olfactive des femelles. Clairement, il sera intéressant de refaire une expérimentation sur les femelles à partir de nouvelles solutions d'huile de paraffine préalablement vérifiées par rapport à des contrôles. Vide pour des femelles mise en élevage à une température de 25°C. En effet, la contamination de ce solvant dans mon étude a vraiment été une surprise qu'il est difficile d'expliquer même *a posteriori*. Dans la nouvelle expérimentation, il faudra vraiment vérifier que le solvant huile de paraffine (qui en théorie n'est pas sensé induire de réponse EAG particulière) n'est vraiment pas détecté par nos femelles de la souche d'élevage du laboratoire et dans les conditions de laboratoire qui leur sont appliquées.

## B. Etude de la détection olfactive des mâles

L'influence de la température de développement sur la capacité de détection olfactive des mâles a été testée avec exactement la même méthodologie que pour la série expérimentale sur les femelles (notamment avec les mêmes odorants, doses d'odorants et solvants). Mes tests sur les contrôles avec la série expérimentale des mâles n'ont toutefois pas montré de problème lié à un effet de l'huile de paraffine utilisée comme solvant des odorants de plantes. En effet, la réponse EAG des mâles n'a pas différencié entre le contrôle avec l'huile de paraffine et le contrôle 'Vide' sans le solvant, et ce pour les deux températures de développement testées ( $F_{1 \text{ vs } 12 \text{ ddl}} < 0,1$   $P = 0,882$  à  $25^{\circ}\text{C}$  et  $F_{1 \text{ vs } 11 \text{ ddl}} = 0,4$   $P = 0,552$  à  $33^{\circ}\text{C}$ ) et comme illustré par les valeurs proches entre les lots 'Empty' et 'Paraffine' dans la Figure 1 du manuscrit de ce chapitre. Ces résultats seront prochainement soumis.



# The effect of temperature on olfactory detection in a moth depends on body mass

Thibaut Bagni, David Siauxsat, Thomas Chertemps, Nicolas Montagné, Annick Maria, Annabelle Fuentes, Philippe Couzi, and Manuel Massot

Sorbonne Université, CNRS, INRAe, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, iEES-Paris, F-75005, Paris, France

**ABSTRACT** - The interest for the effects of climate warming on olfaction of insects is emerging because temperature might impact this key sense. Because body size and mass are negatively influenced by developmental temperature in most ectotherms, the response of the olfactory system of insects to temperature might also be mediated by body size or mass. We tested these hypotheses of direct and indirect of temperature on the olfactory detection in the moth *Spodoptera littoralis*. We measured the antennal sensitivity of males to female sex pheromone and five plant odors using electroantennography. We compared males reared at an optimal temperature (25°C with a daily fluctuation of  $\pm 5^\circ\text{C}$ ) and a high temperature (33  $\pm 5^\circ\text{C}$ ) close the upper limit of *S. littoralis*. As expected, we observed the decrease of male body mass with temperature. Our analyses revealed an interaction between the effects of temperature and body mass for the detection of the six chemicals tested. This interaction was explained by a positive relationship between antennal sensitivity and body mass found only in males developed at the high temperature. In parallel with the need to carry out more studies on thermal dependence of olfaction, our results showed that investigating only direct effects of temperature can be misleading. Futures studies should consider the combined effects of temperature and organism size on olfactory detection.

**KEYWORDS:** chemical communication, electroantennography, temperature, pheromone, plant odorants, insects

## INTRODUCTION

Temperature is a key factor in ectotherms as it influences most of their biological processes (Angilletta, 2009). Therefore, most physiological functions of ectotherms are expected to respond to the rise in temperature associated with the current climate change, with important consequences at higher biological scales like individuals, populations, communities or even ecosystem (Grigaltchik et al. 2012). Chemical communication is a key parameter which has been suggested to be sensitive to climate warming, but the relationship between chemical communication and temperature has been surprisingly little studied (Boullis et al. 2016; Groot & Zizzari 2019; Roggatz et al. 2022). Many insect species use olfaction to perceive and interact with their environment, both for intra- and interspecific cues (Renou & Anton, 2020). In particular, olfactory cues are used to find mates, oviposition sites on suitable host plants, and food (Groot & Zizzari 2019; Renou & Anton 2020). In many moth species, females release a pheromone to attract males, and males have a large number of highly sensitive sex-pheromone receptor neurons (de Bruyne & Baker, 2008). Males are also sensitive to plant odors to find food and favorite habitats of females (Coracini et al. 2004; Rouyar et al. 2015). Temperature may impact pheromonal communication at different steps from biosynthesis, emission, dispersion, detection to behavioral response (Boullis et al. 2016; Roggatz et al. 2022). For example, temperature can change the production and composition of pheromones as revealed in the moth *Phthorimaea operculella* (Ono, 1993) because of changes in enzymatic activities (Groot & Zizzari 2019; Boullis et al. 2016), the pheromone decay (van Oudenhove et al. 2011), and the affinity between odorants and their receptor (Weng et al. 2015).

The goal of our study was to test the effect of developmental temperature on the detection of chemical signals by the pest moth *Spodoptera littoralis*. We measured the antennal sensitivity of males to the major compound of female sex pheromone and five plant odors using electroantennography (EAG). Experimental males were reared at two different temperatures contrasting an optimal developmental temperature (Massot et al. 2021; Bagni et al. 2022) and a high temperature close the upper thermal limit of *S. littoralis*

(unpublished data). We tested the direct effect of temperature on antennal sensitivity, but also a possible indirect effect mediated via the influence of developmental temperature on body size (or mass). The direct effect of temperature on antennal sensitivity was expected to be a decrease of antennal sensitivity between our optimal and unfavorable temperatures. The indirect effect of temperature on antennal sensitivity was predicted from two general patterns observed in ectotherms. Kingsolver and Huey (2008) summarized these patterns by 'Hotter is smaller' and 'Bigger is better'. The pattern 'Hotter is smaller' describes the negative relationship between developmental temperature and adult size. This relationship is known as the temperature-size rule that David Atkinson found in 83% of the studies on ectotherms (Atkinson 1994). We observed this relationship in *S. littoralis* (Massot et al. 2021; Bagni et al. 2022). Body size and mass were also identified as a main target of the impact of climate warming, mostly with a size reduction (Daufresne et al. 2009; Weeks et al. 2020). The second general pattern 'Bigger is better' illustrates that larger individuals have usually better performances. On the basis of the patterns 'Hotter is smaller' and 'Bigger is better', the indirect effect expected is that the high temperature will produce smaller males than with the optimal temperature, and that these small males will be of worse quality with a lower antennal sensitivity. Direct and indirect effects of temperature might be additive effects because they are based on non-mutually exclusive responses.

To our knowledge, only two studies investigated the effect of temperature on the sensitivity to odorants using EAG. In *Drosophila melanogaster*, Martin et al. (2011) showed that odorant detection decreased after a cold treatment (flies reared at 24°C transferred to 15°C for 48 h) and increased after a hot treatment (flies reared at 21°C transferred to 30°C for 48 h). In the moth *Caloptilia fraxinella*, Lemmen and Evenden (2015) tested the influence of temperature and photoregime on the sensitivity of males to the pheromone. The variation in EAG responses depended only on photoregime. Surprisingly, we found a single study investigating the relationship between EAG responses and size of individuals (Spaethe et al. 2007). In the eusocial bumblebee *Bombus terrestris*, Spaethe et al. showed that the antennae of larger workers had higher EAG responses than those of smaller

workers. A similar result based on a behavioral test was a positive relationship between body size and recognition of non nestmates in the eusocial bee *Tetragonisca angustula* (Grüter et al. 2017). On the basis of these evidences of positive correlations between the size of individuals and sensitivity of their olfactory system, we believe that body size and mass are good candidates to mediate the effect of developmental temperature on olfactory detection. As previously mentioned, this indirect effect of temperature does not preclude its direct impact on olfactory detection. The aim of our study was to test these two types of thermal effects with the following predictions: (*j*) direct thermal effect of a decreased antennal sensitivity between optimal and high temperatures; (*ii*) indirect effect of high temperature to produce smaller individuals with lower antennal sensitivity.

## MATERIALS AND METHODS

### Insects

The cotton leafworm *S. littoralis* is a major crop pest from North Africa which is now present in all Africa, south of Europe and Middle East (CABI, 2020). We have already a good knowledge on its thermal biology (Baker & Miller 1974; Sidibé & Laugé 1977; Massot et al. 2021; Bagni et al. 2022) and on its olfactory system (Jönsson & Anderson 1999; Binyameen et al. 2012; de Fouchier et al. 2017), but no study investigated the effect of temperature on the olfactory detection. Experimental animals were obtained from a laboratory strain, reared on a semi artificial diet (Hinks & Byers 1976) at 23°C, 70 % relative humidity, and 16:8 light/dark cycle.

We obtained experimental clutches from mating one male and one female at 23°C for 24h in plastic boxes (10 cm of diameter) with sugar water (20g/L) as food source.

### Temperature treatments

To test the temperature effect on the olfactory system of *S. littoralis*, clutches were first separated in two parts to rear them under two different temperatures. Experimental temperatures had a mean of 25 and 33°C, with a fluctuation of  $\pm 5^\circ\text{C}$  around each mean

temperature (Fig. S1). The mean temperature of 25°C is close to the optimal temperature of *S. littoralis* and the mean temperature of 33°C is close to its upper thermal limit (Sidibé & Laugé 1977; Massot et al. 2021; Bagni et al. 2022). The fluctuation of  $\pm 5^\circ\text{C}$  around the mean temperatures is classical in studies using fluctuating temperatures (*e.g.*, Hagstrum & Leach 1973; Fischer et al. 2011; Tougeron et al. 2021) and is a common value in natural environments (Wang & Dillon 2014).

At the fourth larval instar, 30 larvae were randomly selected to standardize density in the experimental boxes of each clutch-temperature pool. We checked boxes until to detect pupation, the time when the individuals were sexed. After pupation, males and females were separated into different climatic chambers to avoid that males acclimate their sensory system to the female pheromone. After adult emergence, males were kept 24h with sugar water before to test their antennal sensitivity to female pheromone and plant odorants. Males were weighted before their electrophysiological recordings.

## Chemicals

The male response to female pheromone was tested with the major pheromone compound (Z,E)-9,11-14:OAc of *S. littoralis* and five plant odorants of different chemical classes (benzyl alcohol, ( $\pm$ )-linalool, (Z)-3-hexenol, nonanal, (Z)3-hexenyl acetate) (Table S1). We tested five doses for each of these chemicals, from 1 ng to 10  $\mu\text{g}$  for (Z,E)-9,11-14:OAc and from 10 or 100 ng to 100  $\mu\text{g}$  for plant odorants. Plant odorants were selected because previous studies on *S. littoralis* have shown that they induced robust EAG responses (Martel et al. 2009; Saveer et al. 2012; Zakir et al. 2013). The pheromone compound (Z,E)-9,11-14:OAc was diluted in hexane and plants odorants in paraffin oil two solvents that do not induce EAG responses except a mechanic one. We used cartridges (glass Pasteur pipettes) with or without odorants to stimulate animals. As recordings were performed on several days, new cartridges were prepared each day. Ten  $\mu\text{L}$  of solution were deposited on a filter paper in each cartridge with odorants. Control cartridges contained only 10  $\mu\text{L}$  of hexane or paraffin oil on the filter paper. We also used an 'empty' cartridge containing only a filter paper to normalize the mechanic response due to the air

pulses during recordings and to check our control cartridges.

### **Electrophysiology recordings**

Antennal responses to odorants were measured by electroantennography (EAG). EAG recordings were performed during scotophase, using Ringer (NaCl 120mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, HEPES 10 mM, pH 6,5) filled capillary glass electrodes connected to an amplifier. Moths were immobilized in styrofoam holders, then the reference electrode was inserted into the eye and the recording electrode was brought into contact with the tip of antenna with a drop of conductive gel SPECTRA 360 (Parker Laboratories Inc.). Recorded signals were amplified (x500) through a low-pass filter at 1kHz using an EX1 differential amplifier (Dagan, USA) and monitored on a computer using a Digidata 1550A acquisition board (Molecular Devices) controlled by the Clampex 10 software (Molecular Devices). A 2 liter per min (LPM) constant air flow was blown over the antenna. The pulse of stimuli, a 0.5 s air puff at 0.5 LPM, was controlled with a computer-activated electric valve. Each animal was tested with all doses of all odorants, with one minute of recovery time between stimuli. After offline low-pass filtering (50Hz, Gaussian filter), the maximum depolarization amplitude during the odorant stimulation was measured using Clampfit software (Molecular Devices).

### **Statistical analyses**

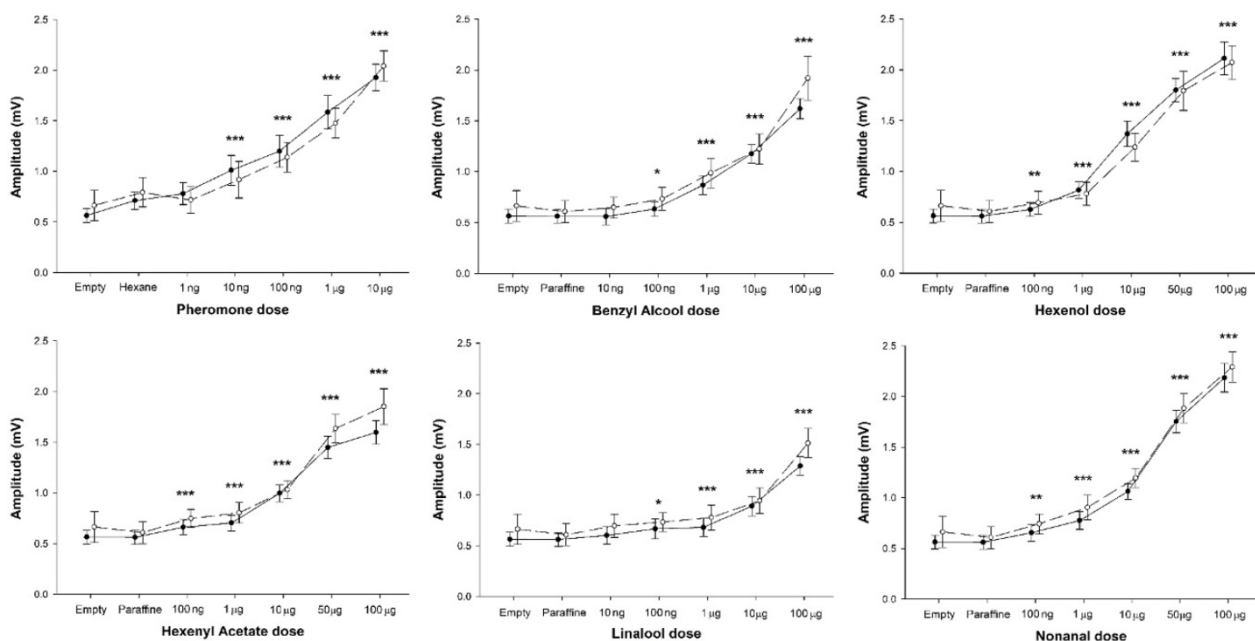
We obtained measurements of antennae sensitivity in 13 males reared at 25°C and 12 males reared at 33°C. EAG responses were log transformed to satisfy normality and homoscedasticity assumptions in our analyses. We used paired t-tests to compare EAG responses of chemicals with control stimulation (hexane for pheromonal stimulus, paraffine for stimuli with plant odors). Student t-test were used to test the temperature effect (25 *versus* 33°C) for each dose of chemicals and controls (hexane, paraffine and empty cartridge), except one Wilcoxon test used for the highest dose of 100 µg of nonanal where normality of EAG responses was not satisfied even with log transformed values. To investigate the indirect effect of temperature from an effect of temperature on male body

mass, we performed regressions with EAG response as dependent variable, temperature, body mass and their interaction as factors.

## RESULTS

### Test of the direct effect of temperature on EAG responses

EAG responses increased with rising doses for the major pheromone compound and plant odorants (Fig. 1). EAG responses to all doses tested were significantly higher than the response to control, except for the lowest dose of the pheromone compound ( $P=0.47$ ), benzyl alcohol ( $P=0.63$ ) and linalool ( $P=0.58$ ). Whatever the dose, EAG responses were not influenced by temperature for the pheromone compound and plants odors (Fig. 1,  $P>0.10$  in all tests performed for each dose of each chemical).



**Fig. 1.** Electroantennography (EAG) responses in males of *S. littoralis* to the major pheromone compound (Z,E)-9,11-14:OAc and five plant odors. The figure shows mean values  $\pm$  s.e.m. for developmental temperatures of 25°C (filled circles and solid lines) and 33°C (open circles and dashed lines). Each dose was compared to the control stimulation (hexane for pheromone stimulations, paraffine for stimulations with plant odors) with paired t-tests. Significant  $P$ -values are reported: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . The temperature effect tested for each dose of pheromone, plant odors, and controls (EAG with no odor, hexane, and paraffine) was always with  $P > 0.10$ .

## Test of the indirect effect of temperature on EAG responses

Body mass decreased with the rise in developmental temperature ( $t_{22} = -3.9, P < 0.001$ ) as expected from the temperature-size rule (Atkinson 1994). Males were larger at 25 than 33°C (Fig. 2).

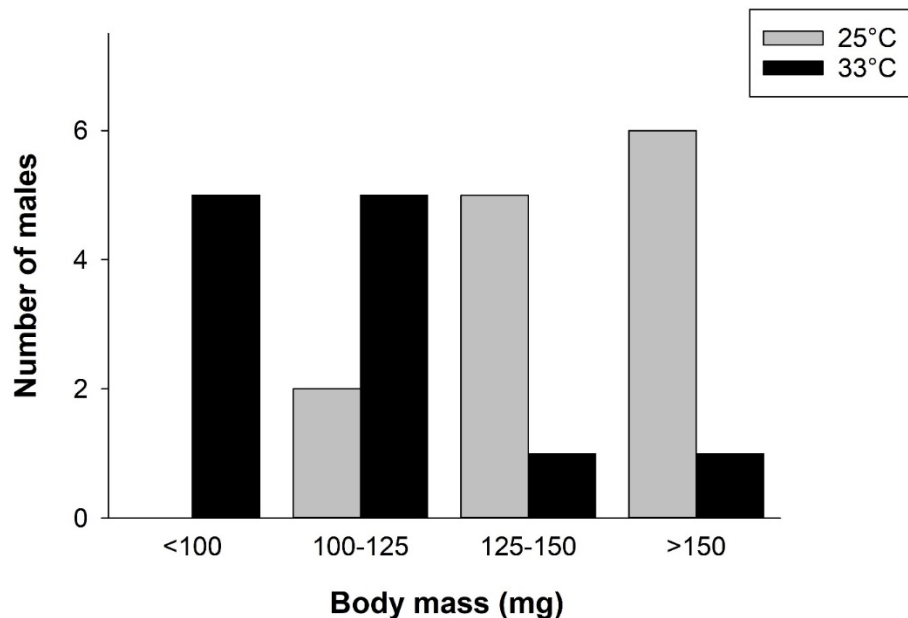


Fig. 2. Distribution of body mass of males between developmental temperatures of 25 and 33°C.

This temperature-size effect opens the possibility for an indirect effect of temperature on antennae sensitivity. We focused our tests on this combined effect of temperature and male body mass on two meaningful doses for each odorant. We selected the highest dose to characterize males that might have totally or partly lost their antennal sensitivity. We selected also the lowest dose of each odorant that induces a significant EAG response (10 ng for pheromone and 100 ng for the five plant odorants: see Fig. 1) in order to select the situation where only a part of males responded to the odorant, *i.e.*, to maximize our chance to characterize the males with a higher antennal sensitivity. Male EAG responses to the lowest dose of the pheromone compound and all plant odorants depended on a significant interaction between temperature and body mass (Table 1). For the highest dose of chemicals, the interaction between temperature and body mass on male EAG response was significant for pheromone, hexenyl acetate and linalool, marginally significant for hexenol and nonanal, and non-significant for benzyl alcohol (Table 1).



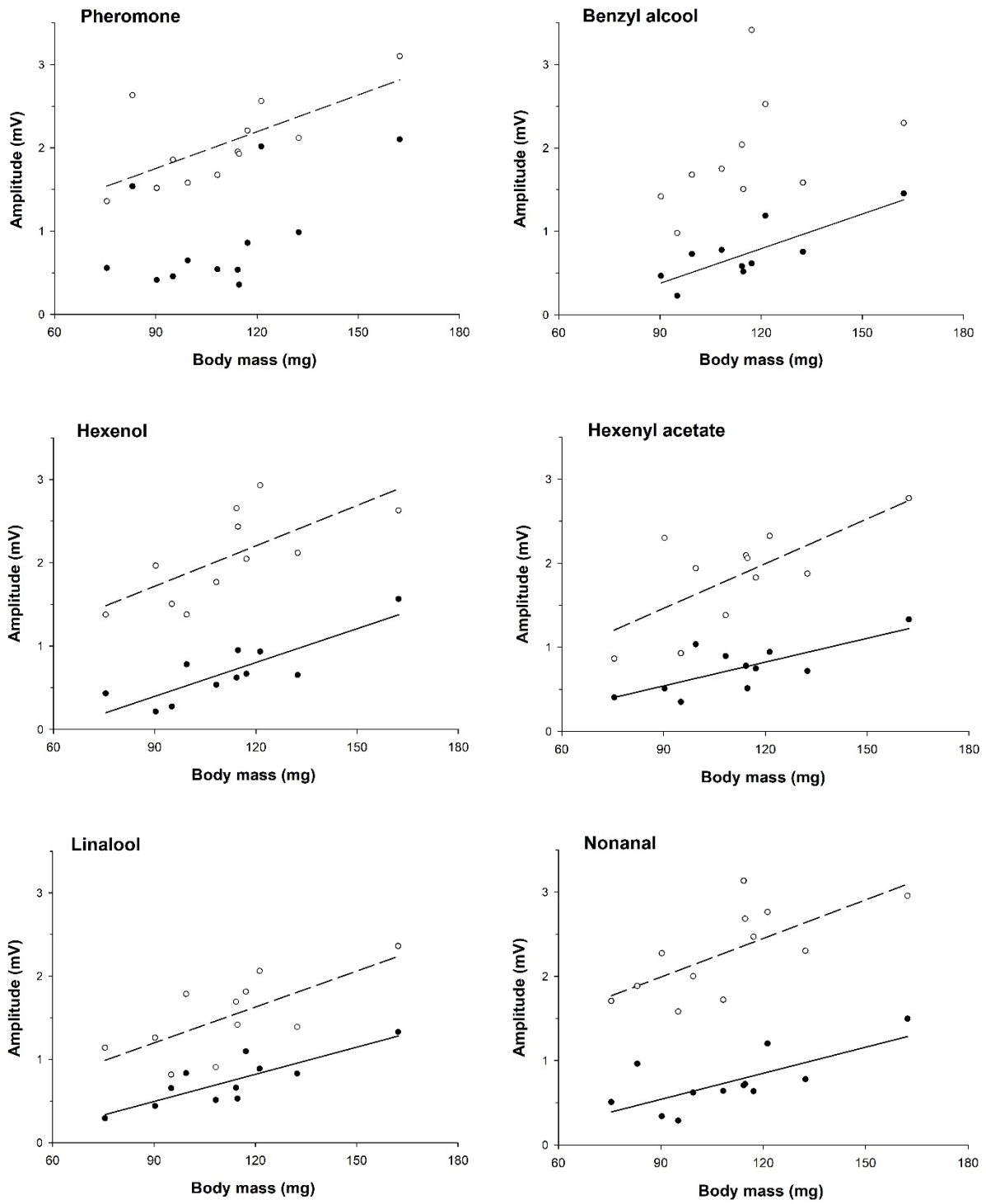
**Table 1.** Tests of the interaction between temperature and male body mass on EAG responses to the major pheromone compound (Z,E)-9,11-14:OAc and five plant odors. Two doses are considered (see text): low dose of 10 ng for pheromone and 100 ng for plant odors; high dose of 10 µg for pheromone and 100 µg for plant odors. Significant results are reported in bold.

	Low dose			High dose		
	<i>F</i> -value	<i>df</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i> -value	<i>df</i>	<i>P</i> -value
<b>Pheromone</b>	<b>6.3</b>	<b>1,21</b>	<b>0.020</b>	<b>10.1</b>	<b>1,21</b>	<b>0.005</b>
<b>Benzyl alcohol</b>	<b>9.2</b>	<b>1,19</b>	<b>0.007</b>	2.5	1,19	0.134
<b>Hexenol</b>	<b>9.9</b>	<b>1,20</b>	<b>0.005</b>	4.0	1,20	0.060
<b>Hexenyl acetate</b>	<b>14.3</b>	<b>1,20</b>	<b>0.001</b>	<b>6.9</b>	<b>1,20</b>	<b>0.016</b>
<b>Linalool</b>	<b>15.6</b>	<b>1,20</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>5.3</b>	<b>1,20</b>	<b>0.032</b>
<b>Nonanal</b>	<b>9.5</b>	<b>1,21</b>	<b>0.006</b>	3.1	1,21	0.092

The interaction between temperature and body mass was explained by a positive relationship between EAG response and body mass observed only in males reared at 33°C (Table 2). At this high developmental temperature, the smallest males had a lower antennal sensitivity than the largest males (Fig. 3).

**Table 2.** Relationships between male body mass and EAG responses. The table shows the slope ± s.e.m. and *P*-value of tested relationships for experimental temperatures and two doses of the major pheromone compound (Z,E)-9,11-14:OAc and plant odors (low and high doses analyzed in Table 1). Significant results are reported in bold.

	Low dose				High dose			
	25°C		33°C		25°C		33°C	
	slope ± s.e.m.	<i>P</i> -value	slope ± s.e.m.	<i>P</i> -value	slope ± s.e.m.	<i>P</i> -value	slope ± s.e.m.	<i>P</i> -value
<b>Pheromone</b>	-0.012 ± 0.007	0.109	+0.014 ± 0.007	0.096	-0.012 ± 0.006	0.098	<b>+0.015 ± 0.005</b>	<b>0.017</b>
<b>Benzyl alcohol</b>	-0.005 ± 0.003	0.285	<b>+0.014 ± 0.004</b>	<b>0.015</b>	-0.001 ± 0.005	0.805	+0.014 ± 0.011	0.145
<b>Hexenol</b>	-0.004 ± 0.003	0.398	<b>+0.014 ± 0.003</b>	<b>0.006</b>	-0.005 ± 0.008	0.631	<b>+0.016 ± 0.006</b>	<b>0.015</b>
<b>Hexenyl acetate</b>	<b>-0.008 ± 0.003</b>	<b>0.043</b>	<b>+0.009 ± 0.003</b>	<b>0.014</b>	-0.007 ± 0.006	0.367	<b>+0.018 ± 0.006</b>	<b>0.022</b>
<b>Linalool</b>	-0.010 ± 0.004	0.067	<b>+0.011 ± 0.002</b>	<b>0.002</b>	-0.004 ± 0.005	0.393	<b>+0.014 ± 0.005</b>	<b>0.035</b>
<b>Nonanal</b>	-0.008 ± 0.004	0.117	<b>+0.010 ± 0.003</b>	<b>0.022</b>	-0.002 ± 0.007	0.682	<b>+0.015 ± 0.005</b>	<b>0.014</b>



**Fig. 3.** Relationships between body mass and EAG responses in males reared at 33°C. The figure shows the low (filled circles and solid lines) and high (open circles and dashed lines) doses analyzed in Table 2.

## DISCUSSION

Although temperature and organism size influence most of biological processes, they are usually studied separately (Gillooly et al. 2002). In particular, to our knowledge, no study on olfactory detection tested the simultaneous and possibly combined effects of temperature and organism size. In our study, we predicted a direct thermal effect of a decreased antennal sensitivity between optimal and high temperatures or/and an indirect effect of high temperature to produce smaller males with lower antennal sensitivity. These direct and indirect effects of temperature are based on non-mutually exclusive hypotheses and could lead to additive effects. The lack of difference in EAG responses between the developmental temperatures was a surprise for two reasons. First, the average antennal sensitivity was clearly unchanged (Fig. 1) while we applied the temperature treatments during the full developmental cycle of *S. littoralis*. Second, we observed a decrease of male body mass with temperature (Fig. 2) and a positive relationship between body mass and antennal sensitivity (Fig. 3), the two conditions expected from the hypothesis of the indirect effect of temperature on antennal sensitivity. The only unexpected result was that the positive relationship between body mass and antennal sensitivity was found only in males developed at the high temperature of 33°C, not in males developed at the favorable temperature of 25°C (Table 2). This difference between developmental temperatures caused a clear interaction between the effects of temperature and body mass on antennal sensitivity (Table 1).

Remarkably, the interaction between the effects of temperature and body mass was revealed for all chemical tested. Similarly, the positive relationship between body mass and antennal sensitivity in males developed at the highest temperature was revealed for all chemical (Table 2). These overall effects suggest that they resulted from the global functioning of antennae, not from effects on particular olfactory receptor neurons. Moreover, because the males developed at 33°C were smaller than the males developed at 25°C, the interaction between temperature and body mass gives evidence that the dependence of antennal sensitivity to body mass differed between the two ranges of male

body mass. Such discontinuities (nonlinear relationships, thresholds) between individual size and biological responses are known to be common (Gillooly et al. 2002). Therefore, the particularly small males produced at 33°C (*i.e.*, the smallest males of the small males produced at 33°C) had a low olfactory detection that leads to the positive relationship between body mass and antennal sensitivity only in males developed at 33°C. The smallest males produced at 33°C might have a too low number of chemosensory neurons to allow an efficient olfaction if the number of sensory neurons was correlated with individual size (via a correlation with the size of antenna) as observed in other insects (Spaethe et al. 2007; Gill et al. 2013; Grüter et al. 2017). Alternatively, the smallest males produced at high temperature might have suffered from a detrimental effect on the development of their chemosensory system. This hypothesis means that larger males produced at high temperature avoided this detrimental effect. We can imagine that larger males are of better quality (the common pattern 'Bigger is better' of Kingsolver and Huey 2008) and more able to preserve their olfactory detection system. The resilience of larger males will be adaptive to avoid a decrease of their ability to find females and reproduce. Such an adaptive protection of male olfaction under the unfavorable temperature might have reinforced the positive relationship between body mass and antennal sensitivity in males developed at 33°C.

Although the interest for the effects of climate change on olfaction is growing in perspective papers (Boullis et al. 2016; Groot & Zizzari 2019; Roggatz et al. 2022), few studies investigated the effect of temperature on odors detection. In addition, the particular context of each study can limit the interest of comparisons between them. This limitation is illustrated by the two studies published about EAG responses relative to temperature (Martin et al. 2011; Lemmen & Evenden 2015). Lemmen and Evenden (2015) investigated sex pheromone detection in males of the moth *Caloptilia fraxinella* in the specific context of diapause. They did not find a difference of EAG responses between cold and favorable temperatures (10 *versus* 24°C). In a study on *Drosophila melanogaster*, Martin et al. (2011) found a decrease of EAG responses after a cold treatment (flies transferred from 24 to 15°C) and an increase of EAG responses after a heat treatment (flies transferred from 21 to

30°C). This study tested responses to temperature shifts that cannot be compared to our results from temperatures applied during the full life-cycle. This limitation of comparing studies with various contexts is related to their rarity and we can hope that this will be solved with more studies on the influence of temperature on olfactory detection.

In parallel with the need to carry out more studies on thermal dependence of olfactory system, we believe also crucial to take into account the size-mediated effects. Indeed, temperature and organism size are key determinants of most biological responses (Gillooly et al. 2002), the negative effect of developmental temperature on ectotherm size is almost universal (Atkinson 1994), and the impact of warming on body size is a major result of studies on climate change (Daufresne et al. 2009; Weeks et al. 2020). To conclude, our study on the combined effect of temperature and individual size shows a promising research avenue to investigate the effects that the climate warming could have on olfactory communication of species. Investigating only direct thermal effects might be misleading and studies should benefit from considering size-mediated effects.

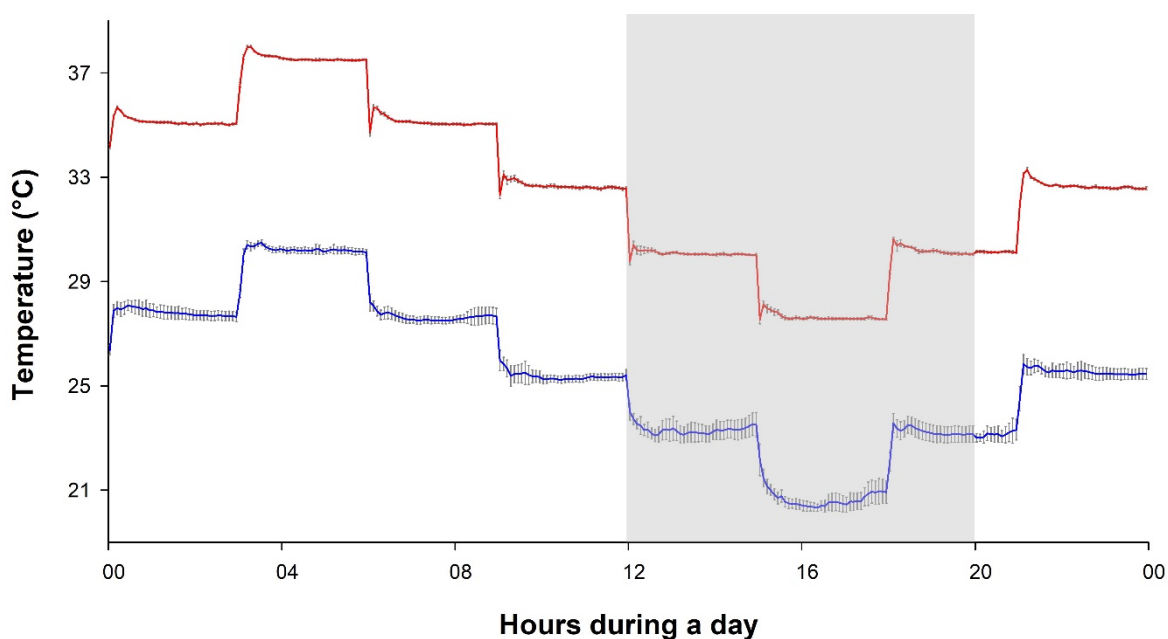
## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Arthur de Fouchier and Rémi Capoduro for discussions on the methodology. We acknowledge funding from the Région Ile-de-France (*Réseau de Recherche sur le Développement Soutenable*, DIM R2DS 2014).

## REFERENCES

Les références de ce manuscrit ont été intégrées aux références globales de la thèse et sont présentées en page 181.

## APPENDIX



**Fig. S1.** The experimental temperatures measured in environmental test chambers. Temperatures were fixed at  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  (blue) and  $33 \pm 5^\circ\text{C}$  (red). Mean values and 95% confidence intervals (vertical bars) were estimated over 24h of measurements performed each five minutes during three weeks using Vaisala HMP110 Temperature probes. For logistic reasons to study the nocturnal moth *S. littoralis*, the scotophase (grey area of the figure) of the 16/8 light/dark cycle was fixed from 12 to 20h.

**Table S1.** List of odorants tested for EAG recordings.

Name	CAS number	Chemical class	Provider	Purity
(Z,E)-9,11-14:OAc	50767-79-8	Esters	Synthesized at the laboratory	94 %
Benzyl alcohol	100-51-6	Aromatics	Prolabo	98 %
(±)-linalool	78-70-6	Terpenes	Merck - Sigma-Aldrich	97 %
(Z)-3-hexenol	928-96-1	Alcohols	Merck - Sigma-Aldrich	98 %
Nonanal	124-19-6	Aldehydes	Merck - Sigma-Aldrich	95 %
(Z)-3-hexenyl acetate	3681-71-8	Esters	Merck - Sigma-Aldrich	≥98 %

## C. Synthèse

La communication chimique des espèces pourrait être altérée par le réchauffement climatique mais cela reste très peu étudié (Boullis et al. 2016; Groot & Zizzari 2019; Roggatz et al. 2022). Les effets de la température sur la capacité de détection olfactive des organismes sont plutôt prédits pour être des effets directs de la température. Toutefois, au moins chez les ectothermes, des effets indirects passant par la taille ou masse corporelle sont envisageables. En effet, plus de 80% des ectothermes montrent une relation négative entre la température de développement et la taille ou masse corporelle adulte (Atkinson et al. 1994). J'ai pu observer cette relation pour la masse corporelle chez *S. littoralis* (Massot et al. 2021; Bagni et al. 2022). Etant donné l'importance que peuvent avoir la taille et la masse corporelle dans diverses performances des individus (Kingsolver et Huey 2008), cette réduction de la taille et masse avec la température donne la possibilité d'une influence indirecte de la température sur la capacité de détection olfactive.

Mon étude sur *S. littoralis* a montré cette influence indirecte de la température sur la capacité de détection olfactive. Les mesures d'électroantennographie de mâles adultes ont en effet été fonction d'une interaction entre température de développement et masse corporelle pour tous les odorants testés. Une relation positive entre masse corporelle et sensibilité olfactive n'a été observée que chez des mâles qui se sont développés avec une température élevée. D'un point de vue méthodologique, mon étude a illustré l'intérêt de prendre en compte la taille ou masse corporelle, des variables largement ignorées dans les études d'électroantennographie.

Plus fondamentalement, mon étude pourrait inciter de futures études sur la détection olfactive des insectes à s'intéresser aux effets de la température de développement. Sur ce point, j'ai été très surpris de ne trouver que deux articles où l'effet de la température avait été testé sur des mesures d'électroantennographie. Plus généralement, la littérature comprend très peu d'études sur les effets de la température et les conséquences du réchauffement climatique sur la communication chimique intra- et interspécifique.

## VII. Discussion générale

L'influence prépondérante de la température sur l'ensemble des processus du vivant (Angilletta 2009), et ses conséquences face au réchauffement climatique global, donnent toute leur importance aux études de la biologie thermique des espèces. A n'en pas douter, c'est un axe de recherche qu'il faudra continuer de développer dans l'étude des insectes ravageurs tel que la noctuelle du coton *Spodoptera littoralis*. Les travaux présentés dans cette thèse illustrent cette nécessité de par les nombreuses influences montrées de la température, influences qui ont souvent été marquées et qui se sont parfois exprimées par des interactions entre facteurs peu suspectées dans la littérature. La thèse aura aussi été l'occasion de souligner des limitations méthodologiques liées à l'utilisation de températures expérimentales constantes, au fait d'ignorer l'importance que peuvent avoir les effets différés intergénérationnels ou de ne pas considérer la covariable individuelle clef qu'est la taille ou masse corporelle. Je pense que ces avancées doivent beaucoup à l'interdisciplinarité de mes encadrants, David Siaussat ayant apporté son expertise en écotoxicologie et physiologie des insectes et Manuel Massot ayant apporté son expertise sur la biologie thermique, la plasticité phénotypique et l'étude de la variabilité interindividuelle.

Avant de discuter de points assez transversaux aux trois grands axes des travaux de la thèse et d'en discuter les perspectives, voici un court rappel des principaux résultats trouvés et de leur importance :

- J'ai clairement constaté une surestimation de la valeur sélective par l'emploi de températures constantes quand les températures d'étude sont élevées, constat dont la généralité a été soutenue par la réalisation d'une revue de la littérature chez les insectes (chapitre VA). Ainsi, il a été montré que travailler à température constante pouvait induire un biais expérimental conduisant à minimiser les effets prédits du réchauffement climatique. L'étude de l'effet de la fluctuation thermique, et de son amplitude, sur la toxicité des insecticides a aussi confirmé la nécessité de travailler avec des températures fluctuantes. Les effets des insecticides peuvent en effet également être minimisés en l'absence de fluctuation.



- La communication chimique des espèces pourrait être altérée par le réchauffement climatique mais cela reste très peu étudié (Boullis et al. 2016; Groot & Zizzari 2019; Roggatz et al. 2022). Les effets de la température sur la capacité de détection olfactive des organismes sont plutôt prédits pour être des effets directs de la température. Toutefois, au moins chez les ectothermes, des effets indirects passant par la taille ou masse corporelle sont envisageables. Mon étude sur *S. littoralis* a montré cette influence indirecte de la température sur la capacité de détection olfactive. Cette étude pourrait aussi inciter de futures études sur la détection olfactive des insectes à s'intéresser davantage aux effets de la température de développement.

- Dans mes travaux sur les effets de la température sur la sensibilité aux insecticides j'ai pu mettre en évidence une interaction entre la température et le chlorpyrifos. Cette interaction a cependant été plus complexe que prédit dans la littérature car elle a également dépendu d'une variabilité du ravageur liée à une composante transgénérationnelle. Ce résultat a confirmé l'existence de ce type d'interaction complexe après la seule observation similaire qui avait été publiée par Tran et al. (2018).

La hausse de l'utilisation des insecticides depuis de nombreuses années a entraîné une croissance importante du nombre d'études s'intéressant à leurs effets sur les organismes et les écosystèmes (Köhler et Triebkorn, 2013). Avec l'augmentation de la température provoquée par le réchauffement climatique, mieux connaître les effets de la température sur l'effet des insecticides pourrait permettre d'optimiser les traitements selon les conditions de température, en choisissant l'insecticide et les doses les plus adaptés. Jusqu'à présent, les modifications des effets des insecticides étaient essentiellement montrées à partir d'études réalisées à des régimes de température constants. Mes travaux ont néanmoins montré que la fluctuation journalière de température pouvait augmenter la toxicité de ces insecticides. Ceci vient renforcer plusieurs études avec des températures fluctuantes, dont plusieurs réalisées sur le chlorpyrifos où j'ai aussi trouvé cet effet (Verheyen et al. 2022, 2019; Verheyen and Stoks 2019a et 2019b), ainsi qu'une étude sur un pyrèthrineoïde (Willming et al. 2013). Un résultat tout à fait original de mon étude a cependant mis en évidence une interaction

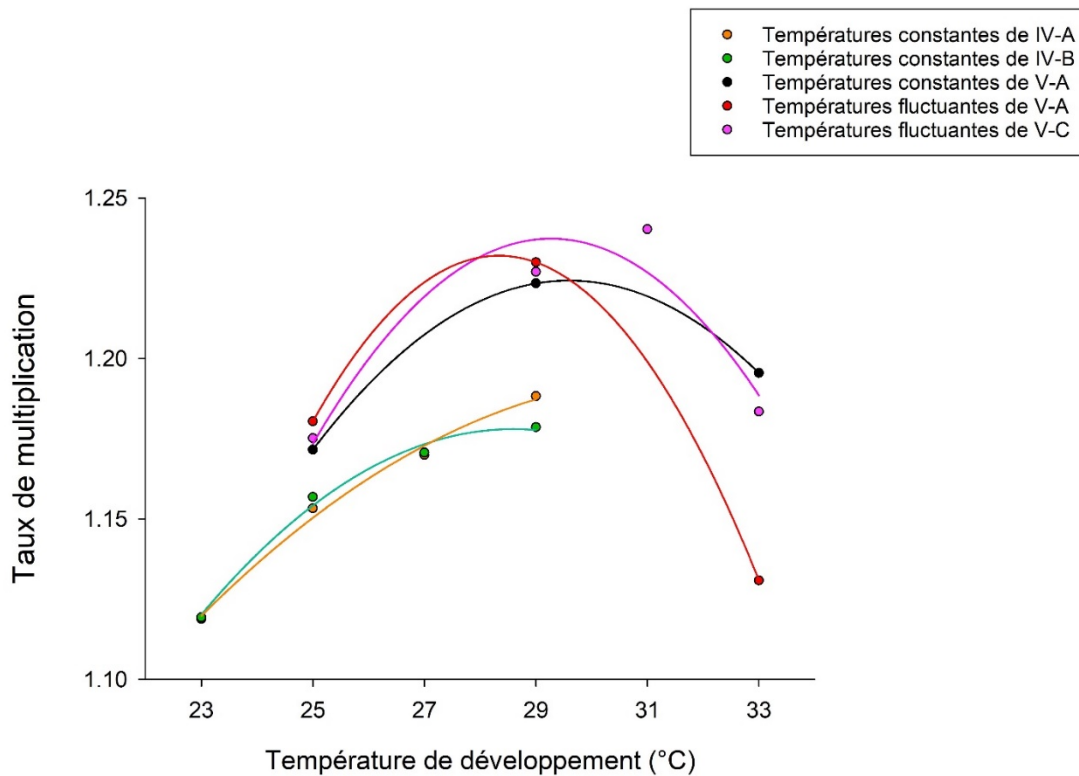
entre l'amplitude de la fluctuation et la température sur la toxicité de la deltaméthrine. L'ensemble de mes résultats a confirmé l'intérêt de prendre en compte la fluctuation des températures dans les études d'écotoxicologie, et plus encore avec l'augmentation de la fluctuation journalière de température observée en parallèle du changement climatique (Wang and Dillon, 2014).

Dans la suite de la discussion, trois grands points vont être abordés. Le premier portera sur un bilan et des éléments de réflexion sur les effets de la température sur *S. littoralis*, le second sur les effets transgénérationnels et le troisième sur la relation entre température et communication chimique. La discussion s'achèvera par des perspectives générales.

### **A. Biologie thermique de *Spodoptera littoralis***

Au cours de mes expérimentations, l'essentiel des paramètres clés du cycle de vie de *S. littoralis* ont été estimés pour différentes températures de développement. Conformément aux prédictions chez les ectothermes (Angilletta 2009), l'ensemble de ces paramètres a répondu aux températures plus élevées. Toutefois, nous avons pu observer des optima et seuils différents pour plusieurs paramètres. Avec les températures journalières fluctuantes de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , les températures moyennes de 25 et 29°C ont été associées aux valeurs maximales du taux d'éclosion, des survies larvaires précoce et tardive, ainsi que de la survie nymphale des femelles. Pour la survie nymphale des mâles, la plage optimale de température a été observée jusque 31°C. L'optimum du taux de développement, tant des mâles que des femelles, a quant à lui été atteint à 33°C, une température défavorable à tous les autres paramètres. C'est particulièrement le cas pour la reproduction d'adultes dont tout le développement s'est déroulé à 33°C et qui n'ont eu aucun succès de leur reproduction (taux d'accouplement d'environ 10% mais taux nul pour l'éclosion des œufs). Ceci rejoint un ancien résultat montré chez *S. littoralis* où des températures constantes de 30°C entraînaient la stérilité des mâles et des femelles (Sidibé et Laugé 1977). L'ensemble de ces résultats a bien montré qu'il est utile d'étudier de multiples paramètres pour apprécier globalement la sensibilité thermique d'une espèce (Mordecai et al. 2019, Sinclair et al. 2016). Mes résultats ont aussi souligné l'importance d'utiliser des régimes fluctuants de température lors des études de

biologie thermique, comme également indiqué par d'autres auteurs (Colinet et al. 2015; Stoks et al. 2017). Ne pas le faire lors d'études de températures élevées expose souvent à la sous-estimation des effets de températures élevées comme montré dans la thèse.



**Figure 25** : Taux de multiplication en fonction de la température de développement. Sont ici montrés les taux de multiplication estimés dans les différentes séries expérimentales des chapitres IV et V de la thèse, et leur indiçage dans la légende correspondant à leurs sous-parties. Pour les expériences IV<sub>A</sub> et B, seuls les lots contrôles sans insecticide sont représentés.

L'étude de l'essentiel des paramètres du cycle de vie pour différentes conditions de températures, avec ou sans fluctuation, a permis d'estimer le taux de multiplication de l'espèce en fonction de la température. La figure 25 montre les taux de multiplication estimés dans mes différentes expériences. On peut en tirer deux grandes observations. La première est que l'optimum thermique global de *S. littoralis* se situe autour de 30-31°C lorsqu'on considère le taux de multiplication qui intègre les réponses des différentes composantes de la valeur sélective. Initialement estimé à 29°C dans les études des parties IV et V<sub>A</sub>, l'optimum a été précisé dans l'étude complémentaire V<sub>B</sub>. La seconde observation est qu'il y a eu une variabilité entre les différentes séries expérimentales. La nette différence entre les séries expérimentales IV<sub>A</sub> et B (lots contrôles des études sur les insecticides) et celles du chapitre V

(études des températures fluctuantes) a été probablement due à un changement dans le protocole de l'élevage du laboratoire. Il avait été en effet constaté dans Bagni et al. 2020 (Annexe A) une relation négative entre la densité larvaire et la masse corporelle des adultes. Cet effet de la densité larvaire avait été assez inattendu car les larves avaient de la nourriture fournie *ad libitum*. Notre hypothèse était que des interactions sociales entre les larves limitaient l'accès à la nourriture pour une partie des larves lorsque la densité était élevée (Bagni et al. 2020). Cet effet négatif de la densité larvaire expliquait qu'il y avait parfois la production d'adultes particulièrement petits produits dans l'élevage du laboratoire. Pour remédier à ce problème, il avait été décidé de réduire la densité larvaire dans les boîtes de l'élevage. Cette réduction de la densité a pour beaucoup éliminé la production d'adultes particulièrement petits dans l'élevage et a sans doute contribué à l'accroissement des taux de multiplication estimés dans les expériences du chapitre V. Une autre grande différence de taux de multiplication a été observée entre les températures fluctuantes à 33°C entre les expériences des parties V<sub>A</sub> et V<sub>C</sub>, avec un taux de multiplication plus petit dans l'expérience V<sub>A</sub> que V<sub>C</sub> (Figure 25). A noter que les taux de multiplication des deux séries expérimentales ont été très similaires pour les températures fluctuantes à 25 et 29°C. La différence à 33°C souligne probablement la grande sensibilité de *S. littoralis* dans la zone thermique proche de sa limite supérieure. L'estimation des taux de multiplication à 33°C a été réalisée en prenant en compte le succès d'incubation des œufs au début du cycle de développement, mais pas le succès de reproduction des adultes en fin de cycle. Avec les estimations du succès de reproduction des adultes dans la partie V<sub>A</sub>, j'ai toutefois constaté l'absence de pontes viables pour la température de 33°C, en régimes constant et fluctuant. Il sera intéressant de préciser la limite du succès de reproduction des adultes après tout leur développement à des températures entre 29 et 33°C, avec une fluctuation journalière de  $\pm 5^\circ\text{C}$ . Sidibé et Laugé (1977) ont montré l'impossibilité de la reproduction de *S. littoralis* à 30°C, mais c'était pour une température constante.

En réponse au réchauffement climatique, on s'attend à ce que *S. littoralis* devienne peu à peu moins abondante dans les régions les plus chaudes d'Afrique et du bassin méditerranéen où l'espèce est actuellement présente. A l'inverse, on s'attend à ce que son aire de

répartition s'étende davantage au sud de l'Europe étant donné l'augmentation des températures qui devrait lever les barrières de températures précédemment trop froides pour l'espèce. En effet, l'expansion de la noctuelle du coton y semble essentiellement empêchée par une trop grande fréquence des gelées (CABI 2021). Ma thèse n'ayant abordée que l'étude de températures relativement élevées entre 23 et 33°C, il serait assez critique de la poursuivre par une étude ciblée sur les températures basses, et notamment celles qui impactent la survie des chrysalides qui est le stade permettant à *S. littoralis* de passer l'hiver (CABI 2021). Dans les régions au climat non extrême pour l'espèce, on s'attend à davantage de dégâts de ce ravageur. En effet, la conséquence majeure du réchauffement climatique sur une telle espèce qui peut avoir plusieurs générations par an (voltinisme) est un accroissement du nombre de générations, ce qui pourrait s'accompagner de dégâts sur une plus longue période de l'année et des abondance plus élevées du ravageur (Altermatt 2010). Mes différentes expérimentations des chapitres IV et V ont toutes montré une très forte accélération du développement de *S. littoralis* avec des températures plus élevées.

Mes résultats sont à relativiser sur certains points. Tout d'abord, j'ai travaillé sur une souche de laboratoire, élevée dans des conditions stables et identiques depuis de nombreuses années. On peut donc facilement imaginer que certaines adaptations à la température aient disparu ou se soient mises en place au cours du temps. Des adaptations locales dans les populations naturelles sont tout à fait possibles selon leur localisation (latitude, altitude) qui les expose à des conditions plutôt froides, chaudes ou intermédiaires dans la zone thermique supportée par *S. littoralis*. Un autre point est que les résultats sont dépendants des conditions expérimentales spécifiques employées et les conditions de laboratoires sont généralement plus favorables que celles présentes en nature. L'absence de certaines régulations comportementales se manifestant en milieu naturel peut aussi être importante à considérer. Comme souligné dans une publication récente (Ma et al. 2021), les comportements de thermorégulation des insectes peuvent par exemple minimiser l'impact de fortes chaleurs. Les insectes sont souvent capables de se déplacer vers des zones plus protégées en s'enfouissant dans le sol ou en s'abritant sous de la végétation.

Au sein d'une population, les individus d'une espèce ne sont pas nécessairement tous au même stade au même moment. Cette variation ontogénétique peut aussi augmenter la résilience de la population aux épisodes de fortes chaleurs du fait que les différents stades peuvent avoir différentes sensibilités thermiques (Ma et al. 2021). Cette différence de sensibilité des stades a été observée dans mes expérimentations (paramètres de survie des larves et chrysalides moins sensibles que la phase de reproduction). Une autre différence intrapopulationnelle potentiellement importante à considérer concerne le dimorphisme sexuel. Des différences de réponses à la température entre mâles et femelles ont été observées dans mes expérimentations. Dans le sous-chapitre V<sub>A</sub>, le taux de survie nymphal à 33°C a été différent pour les femelles selon la présence ou l'absence de fluctuation, alors que cette différence n'a pas été observée chez les mâles. Dans le sous-chapitre V<sub>B</sub>, la relation entre la teneur en eau et la température de développement a aussi différencié entre mâles et femelles. Ces différences de réponses entre mâles et femelles mettent en avant l'intérêt de ne pas limiter les études à un seul sexe. Si suffisamment de publications existaient pour documenter cet aspect, il serait intéressant de réaliser une revue de la littérature sur les effets différentiels de la température entre les sexes chez les insectes.

Un dernier point critique, et sans doute le plus difficile à surmonter, est que les effets de la température sur *S. littoralis* ne reflètent qu'une partie d'une réalité plus vaste dans les environnements naturels. Des effets indirects de la température pourront en effet aussi l'affecter dans son milieu naturel du fait de conséquences du réchauffement climatique sur différentes composantes de son environnement (Lepetz et al. 2009), comme par exemple l'état hydrique du milieu, la qualité des plantes (nourriture, site de reproduction), les prédateurs, les pathogènes, les pratiques culturales, *etc.* Cette diversité des changements dans les contraintes environnementales liés au changement climatique fait que toute étude, la mienne comprise, se doit de rester modeste quant à la nature prédictive de ses résultats.

## **B. Étude des effets transgénérationnels**

Les effets transgénérationnels sont à ce jour peu pris en compte dans les études en écotoxicologie. Mes résultats du chapitre IV sur l'étude de l'interaction entre la température et les

insecticides ont je pense montré toute l'importance à leur accorder. De par les protocoles expérimentaux utilisés dans toutes mes expérimentations (plans factoriels sur des pontes séparées et étudiées dans différentes conditions), je dispose aussi de données permettant de tester la présence d'effets transgénérationnels dans mes études des températures fluctuantes et de la communication chimique. Dans toutes mes études, les parents des pontes étudiées ont aussi été systématiquement pesés. Les relations avec la variation de la masse corporelle des mères seront tout particulièrement intéressantes à examiner comme montré dans Bagni et al. 2020. En plus de cet effet maternel, tester les effets de différences entre les dates des pontes (données disponibles dans toutes les expérimentations qui ont été volontairement étalées dans le temps) sera aussi intéressant du fait des effets de cette variabilité des dates observées dans les deux expériences du chapitre IV (Massot et al. 2021, Bagni et al. 2022). Une étude récente du laboratoire sur *S. littoralis* a aussi montré des effets transgénérationnels de l'action d'un perturbateur endocrinien, le DEHP (Avilès et al., 2020). Dans cette étude, une exposition à certaines concentrations de DEHP a entraîné des effets sur la descendance, avec une accélération du développement larvaire, mais aussi un rallongement du stade chrysalide. Comme on peut le constater, *S. littoralis* est une espèce très sensible aux effets différés entre les générations.

Dans les discussions de mes résultats sur la sensibilité de la descendance à un insecticide, j'ai privilégié l'hypothèse que les effets transgénérationnels reflétaient des effets d'origine maternelle. Dans la littérature, la majorité des effets transgénérationnels présentés sont en effet d'origine maternelle. Pourtant, l'influence des pères pourrait ne pas être toujours à négliger comme le montrent quelques rares études sur ce sujet (Bonduriansky et Head 2007; Gilad et Scharf 2019). Bonduriansky et Head (2007) ont montré que des effets transgénérationnels maternels et paternels pouvaient être présents simultanément et toucher des traits différents de la descendance. Dans leur étude sur la mouche *Telostylinus angusticollis* où il a été regardé les effets de la qualité de la nutrition des parents sur leur descendance, les effets maternels ont touché la taille des œufs et la vitesse de développement des larves, tandis que les effets paternels ont impacté la taille adulte de la descendance. Gilad and

Scharf (2019) ont également montré des effets paternels chez le coléoptère *Tribolium castaneum* où le manque de nourriture ou un stress froid chez les parents pouvaient avoir des conséquences sur la génération suivante, encore une fois sur des traits différents selon qu'ils étaient reliés au père ou à la mère. S'intéresser à l'apport des mâles pour leur descendance chez *S. littoralis* pourrait donc être intéressant dans l'objectif de compléter les informations sur les effets transgénérationnels pour l'espèce.

Si les effets transgénérationnels sur une génération commencent à être assez bien documentés dans la littérature, les études d'effets environnementaux se manifestant sur deux générations sont beaucoup plus rares. Des exemples existent pourtant pour ces effets, surtout chez l'homme et des animaux de laboratoire. Un effet grand-maternel a quand même été montré dans une population naturelle, chez le lézard *Zootoca vivipara*. L'âge de la reproduction de femelles de ce lézard a influencé les caractéristiques de la descendance sur deux générations (Bleu et al. 2022). A noter que cette démonstration d'un effet grand-maternel a demandé 16 années pour acquérir suffisamment de données pour cette espèce assez longévive, alors qu'étudier des effets grand-maternels lié à la température de développement ne demanderait qu'environ quatre mois d'expérience sur *S. littoralis*.

### **C. Effets de la température sur la communication chimique**

Dans notre étude sur la détection olfactive des mâles pour le composé majoritaire de la phéromone et des odeurs de plantes, nous n'avons pas observé d'effet direct de la température. Cependant, conformément à notre autre hypothèse, un effet indirect lié à l'influence de la température sur la taille des individus a été trouvé. A la température haute de 33°C, les mâles de plus petite taille ont moins bien détecté les odorants, alors que cette relation n'a pas été observée chez les mâles élevés à 25°C. Cet exemple a montré l'intérêt de ne pas considérer indépendamment les effets de la température sur la communication chimique et la diminution de la taille par la température qui est très commune chez les ectothermes (Atkinson 1994).



Mon étude a été limitée à une seule étape de la communication chimique, la détection de molécules odorantes. Toutefois, les effets de la température pourraient aussi se manifester sur la transmission et l'intégration de l'information jusqu'au système nerveux central, tout comme sur les comportements spécifiques associés aux différents odorants (comportements sexuels en réponse à la phéromone, comportements liés à la recherche de nourriture ou de sites de pontes en réponse aux odorants de plantes). Les quelques publications s'intéressant aux effets du réchauffement climatique prévoient en effet un impact sur toutes les étapes de la communication chimique (Boullis et al., 2016). On s'attend par exemple à une modification de certains odorants au niveau de leur synthèse par les organismes (Groot & Zizzari, 2019), à une dégradation différente des molécules odorantes selon la température (van Oudenhove et al., 2011) ou même à une modification de l'affinité entre les odorants et leurs récepteurs (Weng et al. 2015). Il est important de s'intéresser à l'ensemble de ces mécanismes du fait qu'ils peuvent modifier l'efficacité de certaines techniques de lutte biologique (piégeage, lutte par confusion sexuelle avec des phéromones).

En termes de perspectives, il faudra en premier lieu relancer des expérimentations sur les femelles suite à la possible contamination du solvant qui a invalidé mon expérimentation. Dans mon étude, seule l'amplitude maximale des potentiels d'actions a été analysée pour mesurer la réponse aux stimuli des odorants, comme c'est généralement fait. Cependant, d'autres paramètres peuvent être intéressants à examiner, comme par exemple le temps écoulé pour un retour à la ligne de base qui est lié au temps de retour de la sensibilité de l'antenne pour détecter les odorants. Ces paramètres sont disponibles dans mon jeu de données et pourront être analysés dans le futur, peut-être en complément de la nouvelle expérimentation sur les femelles. Lors de cette nouvelle série d'expérimentation, il pourra également être intéressant d'étudier l'impact de la température sur la formation des organes olfactifs, et particulièrement celle des antennes. On pourrait effectivement s'attendre à une diminution de leur taille, qui pourrait être accompagnée d'une diminution du nombre sensilles, et donc de récepteurs olfactifs, pouvant en partie expliquer les différences de sensibilité selon les températures de développement. Pour aller au-delà de la phase de détection

des signaux odorants et étudier leur expression comportementale, il serait aussi intéressant de compléter l'étude avec des observations en tunnel de vol (Quero et al. 1996).

## D. Perspectives générales

En plus des perspectives spécifiques déjà évoquées dans les précédentes parties de la discussion, les cinq perspectives qui suivent me semble mériter une attention particulière.

**Enzymes de détoxification** - Parmi les mécanismes pouvant expliquer la modification de l'effet des insecticides par la température, une augmentation de l'activité des enzymes de détoxification, telles que les Glutathione-S-transférases (GSTs) (Durand et al. 2018), est une possibilité envisagée. Leur activité pourrait augmenter avec la température comme pour d'autres enzymes (Angilletta 2009; Kingsolver 2009), ce qui permettrait une meilleure et plus rapide inactivation et élimination des insecticides. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'activité de ces enzymes (en mesurant l'expression des gènes codants par qRT-PCR) en croisant des traitements par différents insecticides avec différentes températures.

**Heat Shock Proteins** - Une des réponses des organismes pour résister à des températures élevées est de produire des Heat Shock Proteins (HSP). Une étude a récemment montré une forte expression de deux Hsp (Hsp70 et Hsp90) ainsi que celle du facteur de transcription (HSF) chez *S. littoralis* après un traitement d'une heure à 42°C (Guz et al. 2021). A partir d'adultes ayant fait leur cycle de développement à des régimes de température plus ou moins chauds, il pourrait donc être intéressant de mesurer l'expression des gènes codant pour différentes Hsp par qRT-PCR, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en place par *S. littoralis* pour faire face à des températures élevées. J'ai conservé des échantillons de mes adultes mâles et femelles testés dans l'étude de la communication chimique pour pouvoir les analyser sur cet aspect.

**Régulation hormonale** - Le développement post embryonnaire des insectes est fortement régulé par des hormones (Lafont 2000). Lors de mes expérimentations à 33°C, avec ou sans fluctuation, j'ai constaté que la plus grande partie de la mortalité des larves avait eu lieu juste

avant le passage au stade chrysalide. Je trouvais souvent des larves ayant commencé à se transformer mais n'ayant pas réussi à aller au bout du processus pour former une chrysalide viable. Lors du dernier stade larvaire, on a généralement un pic d'ecdystéroïde juste avant le début de la transformation en chrysalide (Maria et al. 2019). Il serait intéressant de tester si la température n'influence pas le système hormonal à ce stade de développement, avec des perturbations à température élevée. Pour cela, on pourrait quantifier les ecdystéroïdes présentes dans l'hémolymphe par EIA (Enzyme ImmunoAssay).

**Effets de la température sur les coûts énergétiques et le rythme d'activité** - L'augmentation exponentielle du métabolisme avec la température (Colinet et al. 2015; Ruel & Ayres 1999) équivaut à des coûts de maintenance pour les organismes ectothermes. Lors d'un comité de thèse, une réflexion a été initiée par David Renault sur la mesure de cet effet sur le métabolisme en effectuant une analyse de respirométrie dans différentes conditions de températures. En parallèle, étudier l'influence de la température sur le rythme d'activité des espèces pourrait renseigner sur un mécanisme d'adaptation à des périodes de fortes chaleurs. Il serait particulièrement instructif de comparer les réponses des rythmes d'activité d'une espèce nocturne comme *S. littoralis* avec celles d'une espèce diurne comme par exemple l'espèce modèle *Drosophila melanogaster*. On peut je pense s'attendre à des décalages de l'activité pour éviter des températures défavorables, mais avec des contraintes et coûts spécifiques associés à une activité nocturne ou diurne. Par exemple, une période très chaude de type caniculaire devrait davantage contraindre la période d'activité des espèces diurnes avec le pic de chaleur pendant le jour, alors qu'elle devrait davantage peser sur les coûts métaboliques d'ectothermes nocturnes, coûts qui augmenteraient considérablement pendant leur phase de repos diurne.

**Étude de souches issues de populations naturelles** - Comme cela a été évoqué précédemment, une des limites de cette thèse est d'avoir travaillé sur une souche de laboratoire, souche élevée dans des conditions stables et contrôlées depuis de nombreuses années. Il serait extrêmement instructif de réaliser une étude de biologie thermique sur des pontes

issues d'individus capturés en nature à différentes localités de l'aire de répartition de *S. littoralis*. Ceci permettrait de juger si des adaptations locales existent avec des différences d'optimum thermique pour tel ou tel paramètre de la valeur sélective, ou encore des seuils de tolérance différents aux températures basses ou élevées. Dans le plan initial de la thèse, cette idée était prévue sous réserves d'obtenir des financements pour cela, financements qui n'ont malheureusement pas été obtenus. Une collaboration était notamment envisagée avec des partenaires au Maroc (Kacem Rharrabe, Université de Larache).

## Références

- Agosta, S. J. (2008). Fitness consequences of host use in the field: Temporal variation in performance and a life history tradeoff in the moth *Rothschildia lebeau* (Saturniidae). *Oecologia*, 157(1), 69–82. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1059-1>
- Altermatt, F. (2010). Climatic warming increases voltinism in European butterflies and moths. *Proc. R. Soc. B*, 277, 1281–1287.
- Amaroli, A. (2014). The Effects of Temperature Variation on the Sensitivity to Pesticides: a Study on the Slime Mould *Dictyostelium discoideum* (Protozoa). *Microb. Ecol.* 70, 244–254. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0541-z>
- Angilletta, M.J. (2009). *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Arias, B. M., Poupin, J. M., & Lardies, M. A. (2011). Plasticity of life-cycle, physiological thermal traits and Hsp70 gene expression in an insect along the ontogeny: Effect of temperature variability. *Journal of Thermal Biology*, 36(6), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.06.011>
- Atkinson, D. (1996). Ectotherm life-history responses to developmental temperature, in: Johnston, I.A., Bennett, A.F. (Eds.), *Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptation*. Cambridge Univ. Press, pp. 183–204.
- Atkinson, D. (1994). Temperature and Organism Size—A Biological Law for Ectotherms?, in: *Advances in Ecological Research*. Elsevier, pp. 1–58. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60212-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60212-3)
- Avilès, A., Cordeiro, A., Maria, A., Bozzolan, F., Boulogne, I., Dacher, M., Goutte, A., Alliot, F., Maibeche, M., Massot, M., Siaussat, D. (2020). Effects of DEHP on the ecdysteroid pathway, sexual behavior and offspring of the moth *Spodoptera littoralis*. *Horm. Behav.* 125, 104808. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104808>
- Bagni, T., Siaussat, D., Maria, A., Couzi, P., Maibèche, M., Massot, M. (2020). A maternal effect influences sensitivity to chlorpyrifos pesticide in the pest moth *Spodoptera littoralis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 204, 111052. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111052>
- Bagni, T., Siaussat, D., Maria, A., Couzi, P., Maibèche, M., & Massot, M. (2022). The impact of temperature on insecticide sensitivity depends on transgenerational effects. *Science of The Total Environment*, 851(1), 158140. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158140>
- Baker, C., & Miller, G. (1974). Some effects of temperature and larval food on the development of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 63, 495–511.
- Bashey, F. (2006). Cross-generational environmental effects and the evolution of offspring size in the Trinidadian guppy *Poecilia reticulata*. *Evolution* 60, 348–361. <http://dx.doi.org/inee.bib.cnrs.fr/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01111.x>
- Bastin-Héline, L., de Fouchier, A., Cao, S., Koutroumpa, F., Caballero-Vidal, G., Robakiewicz, S., Monsempe, C., François, M.-C., Ribeyre, T., Maria, A., Chertemps, T., de Cian, A., Walker, W.B., Wang, G., Jacquin-Joly, E., Montagné, N. (2019). A novel lineage of candidate pheromone receptors for sex communication in moths. *eLife* 8, e49826. <https://doi.org/10.7554/eLife.49826>
- Battisti, A., Stastny, M., Netherer, S., Robinet, C., Schopf, A., Roques, A., Larsson, S. (2005). Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecol. Appl.* 15, 2084–2096. <https://doi.org/10.1890/04-1903>

- Benton, T.G., Plaistow, S.J., Coulson, T.N. (2006). Complex population dynamics and complex causation: devils, details and demography. *Proc. R. Soc. B.* 273, 1173–1181. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3495>
- Bernardo, J. (1996a). Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* 36, 83–105. <https://doi.org/10.1093/icb/36.2.83>
- Bernardo, J. (1996b). The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: Patterns, models, quality of evidence and interpretations. *American Zoologist*, 36(2), 216–236. <https://doi.org/10.1093/icb/36.2.216>
- Bessa-Gomes, C., Legendre, S., & Clobert, J. (2010). Discrete two-sex models of population dynamics: On modelling the mating function. *Acta Oecologica*, 36(5), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2010.02.010>
- Binyameen, M., Anderson, P., Ignell, R., Seada, M.A., Hansson, B.S., Schlyter, F. (2012). Spatial Organization of Antennal Olfactory Sensory Neurons in the Female *Spodoptera littoralis* Moth: Differences in Sensitivity and Temporal Characteristics. *Chem. Senses* 37, 613–629. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs043>
- Bleu, J., Meylan, S., Clobert, J., Massot, M. (2022). Grandmaternal age at reproduction affects grandoffspring body condition, reproduction and survival in a wild population of lizards. *Funct. Ecol.* 36, 826–836. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13996>
- Bonduriansky, R., Head, M. (2007). Maternal and paternal condition effects on offspring phenotype in *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *J. Evol. Biol.* 20, 2379–2388. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01419.x>
- Boullis, A., Detrain, C., Francis, F., Verheggen, F.J. (2016). Will climate change affect insect pheromonal communication? *Curr. Opin. Insect Sci.* 17, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.08.006>
- Bradbury, S. P., & Coats, J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. In G. W. Ware (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 133–177). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8850-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8850-0_4)
- Brevik, K., Lindström, L., McKay, S.D., Chen, Y.H. (2018). Transgenerational effects of insecticides - implications for rapid pest evolution in agroecosystems. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.12.007>
- Bruijning, M., Berge, A. C. M., & Jongejans, E. (2018). Population-level responses to temperature, density and clonal differences in *Daphnia magna* as revealed by integral projection modeling. *Functional Ecology*, 32(10), 2407–2422. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13192>
- CABI (2020). *Spodoptera littoralis* (cotton leafworm). In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International.
- Casida, J.E. (2009). Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619. <https://doi.org/10.1021/tx8004949>
- Caswell, H. (2001). *Matrix population models: Construction, analysis, and interpretation*, 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Cocquempot, C., Ramel, J.-M. (2008). La noctuelle africaine du coton en voie de sédentarisation en France? *PHM Rev. Hortic.* 506, pp.33-36. [hal-01137130](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01137130)
- Colinet, H., Sinclair, B. J., Vernon, P., & Renault, D. (2015). Insects in fluctuating thermal environments. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 123–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017>
- Coracini, M., Bengtsson, M., Liblikas, I., Witzgall, P. (2004). Attraction of codling moth males to apple volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 110, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00124.x>

- Cutler, G.C. (2013). Insects, Insecticides and Hormesis: Evidence and Considerations for Study. Dose-Response 11, dose-response.1. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008>. Cutler
- Daufresne, M., Lengfellner, K., Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12788–12793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902080106>
- de Bruyne, M., Baker, T.C. (2008). Odor Detection in Insects: Volatile Codes. *J. Chem. Ecol.* 34, 882–897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- de Fouchier, A., Walker, W.B., Montagné, N., Steiner, C., Binyameen, M., Schlyter, F., Chertemps, T., Maria, A., François, M.-C., Monsempes, C., Anderson, P., Hansson, B.S., Larsson, M.C., Jacquín-Joly, E. (2017). Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by de-orphanization of a moth repertoire. *Nat. Commun.* 8, 15709. <https://doi.org/10.1038/ncomms15709>
- Delnat, V., Tran, T.T., Verheyen, J., Van Dinh, K., Janssens, L., Stoks, R., 2019. Temperature variation magnifies chlorpyrifos toxicity differently between larval and adult mosquitoes. *Sci. Total Environ.* 690, 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.030>
- Delnat, V., Verborgt, J., Janssens, L., Stoks, R., 2021. Daily temperature variation lowers the lethal and sublethal impact of a pesticide pulse due to a higher degradation rate. *Chemosphere* 263, 128114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128114>
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., & Martin, P. R. (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6668–6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Tigchelaar, M., Battisti, D.S., Merrill, S.C., Huey, R.B., Naylor, R.L. (2018). Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science* 361, 916–919. <https://doi.org/10.1126/science.aat3466>
- Dewar, Y., Pottier, M.-A., Lalouette, L., Maria, A., Dacher, M., Belzunces, L.P., Kairo, G., Renault, D., Maibeche, M., Siaussat, D. (2016). Behavioral and metabolic effects of sublethal doses of two insecticides, chlorpyrifos and methomyl, in the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3086–3096. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5710-1>
- Dillon, M. E., Wang, G., Garrity, P. A., & Huey, R. B. (2009). Thermal preference in *Drosophila*. *Journal of Thermal Biology*, 34(3), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2008.11.007>
- Dinh, K. V., Janssens, L., & Stoks, R. (2016). Exposure to a heat wave under food limitation makes an agricultural insecticide lethal: A mechanistic laboratory experiment. *Global Change Biology*, 22(10), 3361–3372. <https://doi.org/10.1111/gcb.13415>
- Durand, N., Pottier, M.-A., Siaussat, D., Bozzolan, F., Maibèche, M., Chertemps, T. (2018). Glutathione-S-Transferases in the Olfactory Organ of the Noctuid Moth *Spodoptera littoralis*, Diversity and Conservation of Chemosensory Clades. *Front. Physiol.* 9, 1283. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01283>
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 243–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Ferrière, R., Sarrazin, F., Legendre, S., & Baron, J.-P. (1996). Matrix population models applied to viability analysis and conservation: Theory and practice using the ULM software. *Acta Oecologica*, 17, 629–656.
- Fischer, E. M., & Schär, C. (2010). Consistent geographical patterns of changes in high-impact European heatwaves. *Nature Geoscience*, 3(6), 398–403. <https://doi.org/10.1038/ngeo866>

- Fischer, K., Kölzow, N., Höltje, H., & Karl, I. (2011). Assay conditions in laboratory experiments: Is the use of constant rather than fluctuating temperatures justified when investigating temperature-induced plasticity? *Oecologia*, *166*(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1917-0>
- Fournier-Level, A., Neumann-Mondlak, A., Good, R.T., Green, L.M., Schmidt, J.M., Robin, C. (2016). Behavioural response to combined insecticide and temperature stress in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* *29*, 1030–44. <https://doi.org/10.1111/jeb.12844>
- Galliard, J.F.L., Massot, M., Clobert, J. (2012). Dispersal and range dynamics in changing climates: a review, in: Clobert, J., Baguette, M., Benton, T.G., Bullock, J.M. (Eds.), *Dispersal Ecology and Evolution*. Oxford University Press, pp. 317–336. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199608898.003.0025>
- Gilad, T., Scharf, I. (2019). Separation between maternal and paternal effects on offspring following exposure of adult red flour beetles to two stressors. *Ecol. Entomol.* *44*, 494–501. <https://doi.org/10.1111/een.12726>
- Gill, K.P., van Wilgenburg, E., Macmillan, D.L., Elgar, M.A. (2013). Density of Antennal Sensilla Influences Efficacy of Communication in a Social Insect. *Am. Nat.* *182*, 834–840. <https://doi.org/10.1086/673712>
- Gillooly, James.F., Charnov, E.L., West, G.B., Savage, V.M., Brown, J.H. (2002). Effects of size and temperature on developmental time. *Nature* *417*, 70–73. <https://doi.org/10.1038/417070a>
- Goulding, A. T., Shelley, L. K., Ross, P. S., & Kennedy, C. J. (2013). Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *157*(3), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.01.001>
- Grigaltchik, V.S., Ward, A.J.W., Seebacher, F. (2012). Thermal acclimation of interactions: differential responses to temperature change alter predator–prey relationship. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *279*, 4058–4064. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1277>
- Groot, A.T., Zizzari, Z.V. (2019). Does climate warming influence sexual chemical signaling? *Anim. Biol.* *69*, 83–93. <https://doi.org/10.1163/15707563-20191103>
- Grüter, C., Segers, F.H.I.D., Santos, L.L.G., Hammel, B., Zimmermann, U., Nascimento, F.S. (2017). Enemy recognition is linked to soldier size in a polymorphic stingless bee. *Biol. Lett.* *13*, 20170511. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0511>
- Guz, N., Dageri, A., Altincicek, B., Aksoy, S. (2021). Molecular characterization and expression patterns of heat shock proteins in *Spodoptera littoralis*, heat shock or immune response? *Cell Stress Chaperones* *26*, 29–40. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01149-2>
- Hagstrum, D. W., & Leach, C. E. (1973). Role of constant and fluctuating temperatures in determining development time and fecundity of three species of stored-products Coleoptera. *Annals of the Entomological Society of America*, *66*(2), 407–410. <https://doi.org/10.1093/aesa/66.2.407>
- Haug, G., & Hoffman, G. (1990). Synthetic pyrethroid insecticides: Structures and properties. In *Chemistry of Plant Protection* (Vol. 4). Springer New York.
- Hinks, C.F., Byers, J.R. (1976). Biosystematics of the genus *Euxoa* (Lepidoptera: Noctuidae): V. Rearing procedures, and life cycles of 36 species. *Can. Entomol.* *108*, 1345–1357. <https://doi.org/10.4039/Ent1081345-12>
- Hooper, M.J., Ankley, G.T., Cristol, D.A., Maryoung, L.A., Noyes, P.D., Pinkerton, K.E. (2013). Interactions between chemical and climate stressors: A role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. *Environ. Toxicol. Chem.* *32*, 32–48. <https://doi.org/10.1002/etc.2043>



- Huey, R. B., & Berrigan, D. (2001). Temperature, demography, and ectotherm fitness. *The American Naturalist*, 158(2), 204–210. <https://doi.org/10.1086/321314>
- Johnson, L.R., Ben-Horin, T., Lafferty, K.D., McNally, A., Mordecai, E., Paaijmans, K.P., Pawar, S., Ryan, S.J. (2015). Understanding uncertainty in temperature effects on vector-borne disease: a Bayesian approach. *Ecology* 96, 203–213. <https://doi.org/10.1890/13-1964.1>
- Jonsson, M., Anderson, P. (1999). Electrophysiological response to herbivore-induced host plant volatiles in the moth *Spodoptera littoralis*. *Physiol. Entomol.* 24, 377–385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00154.x>
- Kearney, M., Shine, R., & Porter, W. P. (2009). The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3835–3840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808913106>
- Kehat, M., & Gordon, D. (1975). Mating, longevity, fertility and fecundity of the cotton leaf- worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Phytoparasitica*, 3(2), 87–102. <https://doi.org/10.1007/BF03158291>
- Khafagi, W.E., Hegazi, E.M., Aamer, N.A. (2016). Effects of temperature on the development, food consumption and utilization parameters of the last two larval instars of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *J. Agric. Sci. Food Sci. Technol.* 2, 93–99.
- Kingsolver, J.G. (2009). The well-temperated biologist. *Am. Nat.* 174, 755–768. <https://doi.org/10.1086/648310>
- Kingsolver, J. G., Ragland, G. J., & Shlichta, J. G. (2004). Quantitative genetics of continuous reaction norms: thermal sensitivity of caterpillar growth rates. *Evolution* 58(7), 1521–29. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01732.x>
- Kingsolver, J.G., Huey, R.B. (2008). Size, temperature, and fitness: three rules. *Evol. Ecol. Res.* 18.
- Kohler, H.-R., Triebkorn, R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* 341, 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Lafont, R. (2000). Understanding insect endocrine systems: molecular approaches\*. *Entomol. Exp. Appl.* 97, 123–136. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00723.x>
- Lalouette, L., Pottier, M.-A., Wycke, M.-A., Boitard, C., Bozzolan, F., Maria, A., Demondion, E., Chertemps, T., Lucas, P., Renault, D., Maibeche, M., & Siauxat, D. (2016). Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3073–3085. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5923-3>
- Latzel, V. (2015). Pitfalls in ecological research: Transgenerational effects. *Folia Geobot.* 50, 75–85. <https://doi.org/10.1007/s12224-015-9208-x>
- Legendre, S., Clobert, J. (1995). ULM, a software for conservation and evolutionary biologists. *J. Appl. Stat.* 22, 817–834. <https://doi.org/10.1080/02664769524649>
- Lemmen, J., Evenden, M. (2015). Environmental conditions terminate reproductive diapause and influence pheromone perception in the long-lived moth *Caloptilia fraxinella*. *Physiol. Entomol.* 40, 30–42. <https://doi.org/10.1111/phen.12086>
- Lepetz, V., Massot, M., Chaine, A.S., Clobert, J. (2009). Climate warming and the evolution of morphotypes in a reptile. *Glob. Change Biol.* 15, 454–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01761.x>
- Lima, M.P.R., Cardoso, D.N., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S. (2015). Carbaryl toxicity prediction to soil organisms under high and low temperature regimes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.004>

- Lydy, M.J., Belden, J.B., Ternes, M.A. (1999). Effects of temperature on the toxicity of m-parathion, chlorpyrifos, and pentachlorobenzene to *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 542–547. <https://doi.org/10.1007/s002449900550>
- Lyons, C. L., Coetzee, M., & Chown, S. L. (2013). Stable and fluctuating temperature effects on the development rate and survival of two malaria vectors, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*, 6(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-104>
- Ma, C.-S., Ma, G., Pincebourde, S. (2021). Survive a Warming Climate: Insect Responses to Extreme High Temperatures. *Annu. Rev. Entomol.* 66, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-041520-074454>
- Ma, G., Hoffmann, A. A., & Ma, C.-S. (2015). Daily temperature extremes play an important role in predicting thermal effects. *Journal of Experimental Biology*, jeb.122127. <https://doi.org/10.1242/jeb.122127>
- Malbert-Colas, A., Drozd, T., Massot, M., Bagni, T., Chertemps, T., Maria, A., Maïbèche, M., Siaussat, D. (2020). Effects of low concentrations of deltamethrin are dependent on developmental stages and sexes in the pest moth *Spodoptera littoralis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10181-9>
- Malo, E.A., Renou, M., Guerrero, A. (2000). Analytical studies of *Spodoptera littoralis* sex pheromone components by electroantennography and coupled gas chromatography–electroantennographic detection. *Talanta* 52, 525–532. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00401-X)
- Maria, A., Malbert-Colas, A., Boulogne, I., Braman, V., Boitard, C., Dacher, M., Chertemps, T., Maïbèche, M., Blais, C., Siaussat, D. (2019). Effects of bisphenol A on post-embryonic development of the cotton pest *Spodoptera littoralis*. *Chemosphere* 235, 616–625. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.073>
- Marshall, D. J., Heppell, S. S., Munch, S. B., & Warner, R. R. (2010). The relationship between maternal phenotype and offspring quality: Do older mothers really produce the best offspring? *Ecology*, 91(10), 2862–2873. <https://doi.org/10.1890/09-0156.1>
- Martel, V., Anderson, P., Hansson, B.S., Schlyter, F. (2009). Peripheral modulation of olfaction by physiological state in the Egyptian leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 55, 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.04.012>
- Martin, F., Riveron, J., Alcorta, E. (2011). Environmental temperature modulates olfactory reception in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 57, 1631–1642. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.08.016>
- Martin, T. L., & Huey, R. B. (2008). Why “suboptimal” is optimal: Jensen’s inequality and ectotherm thermal preferences. *American Naturalist*, 171(3), E102–E118. <https://doi.org/10.1086/527502>
- Massot, M., Bagni, T., Maria, A., Couzi, P., Drozd, T., Malbert-Colas, A., Maïbèche, M., Siaussat, D. (2021). Combined influences of transgenerational effects, temperature and insecticide on the moth *Spodoptera littoralis*. *Environ. Pollut.* 289, 117889. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117889>
- Meng, S., Delnat, V., Stoks, R. (2022a). Multigenerational effects modify the tolerance of mosquito larvae to chlorpyrifos but not to a heat spike and do not change their synergism. *Environ. Pollut.* 292, 118333. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118333>
- Meng, S., Delnat, V., Stoks, R. (2020). The exposure order strongly modifies how a heat spike increases pesticide toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 54, 11476–11484. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03848>
- Meng, S., Tran, T.T., Van Dinh, K., Delnat, V., Stoks, R. (2022b). Acute warming increases pesticide toxicity more than transgenerational warming by reducing the energy budget. *Sci. Total Environ.* 805, 150373. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150373>

- Metcalf, C. J. E., & Pavard, S. (2007). Why evolutionary biologists should be demographers. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(4), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.12.001>
- Moe, S. J., De Schampelaere, K., Clements, W. H., Sorensen, M. T., Van den Brink, P. J., & Liess, M. (2013). Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1), 49–61. <https://doi.org/10.1002/etc.2045>
- Montagné, N., de Fouchier, A., Newcomb, R.D., Jacquin-Joly, E. (2015). Advances in the Identification and Characterization of Olfactory Receptors in Insects, in: Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier, pp. 55–80. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.11.003>
- Moore, M.P., Whiteman, H.H., Martin, R.A. (2019). A mother's legacy: the strength of maternal effects in animal populations. *Ecol. Lett.* 22, 1620–1628. <https://doi.org/10.1111/ele.13351>
- Mordecai, E.A., Caldwell, J.M., Grossman, M.K., Lippi, C.A., Johnson, L.R., Neira, M., Rohr, J.R., Ryan, S.J., Savage, V., Shocket, M.S., Sippy, R., Stewart Ibarra, A.M., Thomas, M.B., Villena, O. (2019). Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecol. Lett.* 22, 1690–1708. <https://doi.org/10.1111/ele.13335>
- Mousseau, T.A., Dingle, H. (1991). Maternal effects in insect life histories. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 511–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002455>
- Mousseau, T. A., & Fox, W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution*, 13(10), 403–407.
- Mousseau, T. A., Uller, T., Wapstra, E., & Badyaev, A. V. (2009). Evolution of maternal effects: Past and present. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 364(1520), 1035–1038.
- Müller, C. (2018). Impacts of sublethal insecticide exposure on insects - Facts and knowledge gaps. *Basic Appl Ecol* 30, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2018.05.001>
- Noyes, P.D., Lema, S.C. (2015). Forecasting the impacts of chemical pollution and climate change interactions on the health of wildlife. *Curr. Zool.* 61, 669–689. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.4.669>
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971–986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>
- Ono, T. (1993). Effect of rearing temperature on pheromone component ratio in potato tuberworm moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Chem. Ecol.* 19, 71–81. <https://doi.org/10.1007/BF00987472>
- Oppold, A., Kreß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J. B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegheuchte, M. B., & Müller, R. (2015). Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036>
- Orr, J. A., Vinebrooke, R. D., Jackson, M. C., Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Mantyka-Pringle, C., Van den Brink, P. J., De Laender, F., Stoks, R., Holmstrup, M., Matthaei, C. D., Monk, W. A., Penk, M. R., Leuzinger, S., Schäfer, R. B., & Piggott, J. J. (2020). Towards a unified study of multiple stressors: Divisions and common goals across research disciplines. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1926), 20200421. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0421>
- Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C., & Thomas, M. B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology*, 19(8), 2373–2380. <https://doi.org/10.1111/gcb.12240>
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J.K., Thomas, C.D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Kullberg, J., Tammaru, T., Tennent, W.J., Thomas, J.A., Warren, M. (1999). Poleward shifts in

- geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399, 579–583. <https://doi.org/10.1038/21181>
- Quero, C., Lucas, P., Renou, M., Guerrero, A. (1996). Behavioral responses of *Spodoptera littoralis* males to sex pheromone components and virgin females in wind tunnel. *J. Chem. Ecol.* 22, 1087–1102. <https://doi.org/10.1007/BF02027947>
- Rahman, H.U., Asghar, W., Nazir, W., Sandhu, M.A., Ahmed, A., Khalid, N. (2021). A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci. Total Environ.* 755, 142649. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>
- Renou, M., Anton, S. (2020). Insect olfactory communication in a complex and changing world. *Curr. Opin. Insect Sci., Neuroscience \* Biomechanics of Insect Flight and Bio-inspired engineering* 42, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.04.004>
- Riskallah, M.R. (1984). Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides to susceptible and resistant larvae of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Experientia* 40, 188–190. <https://doi.org/10.1007/BF01963592>
- Roggatz, C.C., Saha, M., Blanchard, S., Schirmacher, P., Fink, P., Verheggen, F., Hardege, J.D. (2022). Becoming nose-blind—Climate change impacts on chemical communication. *Glob. Change Biol.* 28, 4495–4505. <https://doi.org/10.1111/gcb.16209>
- Rouyar, A., Deisig, N., Dupuy, F., Limousin, D., Wycke, M.-A., Renou, M., Anton, S. (2015). Unexpected plant odor responses in a moth pheromone system. *Front. Physiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00148>
- Ruel, J. J., & Ayres, M. P. (1999). Jensen's inequality predicts effects of environmental variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(9), 361–366. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01664-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01664-X)
- Salama, H.S., Dimetry, N.Z., Salem, S.A. (1971). On the Host Preference and Biology of the Cotton Leaf Worm *Spodoptera littoralis* Bois. *Z. Für Angew. Entomol.* 67, 261–266. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1971.tb02122.x>
- Salinas, S., Munch, S.B. (2012). Thermal legacies: transgenerational effects of temperature on growth in a vertebrate: Thermal transgenerational plasticity. *Ecol. Lett.* 15, 159–163. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01721.x>
- Saveer, A.M., Kromann, S.H., Birgersson, G., Bengtsson, M., Lindblom, T., Balkenius, A., Hansson, B.S., Witzgall, P., Becher, P.G., Ignell, R. (2012). Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 2314–2322. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2710>
- Shama, L.N.S., Strobel, A., Mark, F.C., Wegner, K.M., 2014. Transgenerational plasticity in marine sticklebacks: maternal effects mediate impacts of a warming ocean. *Funct. Ecol.* 28, 1482–1493. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12280>
- Sheldon, K. S., & Dillon, M. E. (2016). Beyond the mean: Biological impacts of cryptic temperature change. *Integrative and Comparative Biology*, 56(1), 110–119. <https://doi.org/10.1093/icb/icw005>
- Sidibé, B., Laugé, G. (1977). Incidence des thermopériodes et de températures constantes sur quelques critères biologiques de *Spodoptera littoralis* Boisduval [Lepidoptera Noctuidae]. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 13, 369–379.
- Sinclair, B.J., Marshall, K.E., Sewell, M.A., Levesque, D.L., Willett, C.S., Slotsbo, S., Dong, Y., Harley, C.D.G., Marshall, D.J., Helmuth, B.S., Huey, R.B. (2016). Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecol. Lett.* 19, 1372–1385. <https://doi.org/10.1111/ele.12686>

- Spaethe, J., Brockmann, A., Halbig, C., Tautz, J. (2007). Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften* 94, 733–739. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0251-1>
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press.
- Stoks, R., Verheyen, J., Van Dievel, M., & Tüzün, N. (2017). Daily temperature variation and extreme high temperatures drive performance and biotic interactions in a warming world. *Current Opinion in Insect Science*, 23, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.06.008>
- Tang, F.H.M., Lenzen, M., McBratney, A., Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nat. Geosci.* 14, 206–210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>
- Tougeron, K., Ferrais, L., Renard, M.-E., & Hance, T. (2021). Effects of constant versus fluctuating temperatures on fitness indicators of the aphid *Dysaphis plantaginea* and the parasitoid *Aphidius matricariae*. *Insects*, 12(10), 855. <https://doi.org/10.3390/insects12100855>
- Tran, T.T., Janssens, L., Dinh, K.V., Stoks, R. (2018). Transgenerational interactions between pesticide exposure and warming in a vector mosquito. *Evol. Appl.* 11, 906–917. <https://doi.org/10.1111/eva.12605>
- Uhl, B., Wölfling, M., & Bässler, C. (2022). Mediterranean moth diversity is sensitive to increasing temperatures and drought under climate change. *Scientific Reports*, 12(1), 14473. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18770-z>
- Vajedsamiei, J., Melzner, F., Raatz, M., Morón Lugo, S.C., Pansch, C., 2021. Cyclic thermal fluctuations can be burden or relief for an ectotherm depending on fluctuations' average and amplitude. *Funct. Ecol.* 35, 2483–2496. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13889>
- van Oudenhove, L., Billoir, E., Boulay, R., Bernstein, C., Cerdá, X. (2011). Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. *Naturwissenschaften* 98, 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0852-6>
- Vasseur, D.A., DeLong, J.P., Gilbert, B., Greig, H.S., Harley, C.D.G., McCann, K.S., Savage, V., Tunney, T.D., O'Connor, M.I., 2014. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proc. R. Soc. B.* 281, 20132612. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2612>
- Verheyen, J., Delnat, V., Stoks, R., 2019. Increased daily temperature fluctuations overrule the ability of gradual thermal evolution to offset the increased pesticide toxicity under global warming. *Environ. Sci. Technol.* 53, 4600–4608. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07166>
- Verheyen, J., Delnat, V., Theys, C., 2022. Daily temperature fluctuations can magnify the toxicity of pesticides. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 51, 100919. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100919>
- Verheyen, J., Stoks, R., 2019a. Current and future daily temperature fluctuations make a pesticide more toxic: Contrasting effects on life history and physiology. *Environ. Pollut.* 248, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.022>
- Verheyen, J., Stoks, R., 2019b. Shrinking Body Size and Physiology Contribute to Geographic Variation and the Higher Toxicity of Pesticides in a Warming World. *Environ. Sci. Technol.* 53, 11515–11523. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03806>
- Wang, G., & Dillon, M. E. (2014). Recent geographic convergence in diurnal and annual temperature cycling flattens global thermal profiles. *Nature Climate Change*, 4(11), 988–992. <https://doi.org/10.1038/nclimate2378>
- Ward, N.L., Masters, G.J. (2007). Linking climate change and species invasion: an illustration using insect herbivores. *Glob. Change Biol.* 13, 1605–1615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01399.x>
- Weeks, B.C., Willard, D.E., Zimova, M., Ellis, A.A., Witynski, M.L., Hennen, M., Winger, B.M. (2020). Shared morphological consequences of global warming in North American migratory birds. *Ecol. Lett.* 23, 316–325. <https://doi.org/10.1111/ele.13434>

- Weng, C., Fu, Y., Jiang, H., Zhuang, S., Li, H. (2015). Binding interaction between a queen pheromone component HOB and pheromone binding protein ASP1 of *Apis cerana*. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.046>
- White, G.C., Burnham, K.P. (1999). Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46, 120–139.
- Whiten, S. R., & Peterson, R. K. D. (2016). The influence of ambient temperature on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the pyrethroid insecticide permethrin. *Journal of Medical Entomology*, 53(1), 139–143. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv159>
- WHO. (1989). *Deltamethrin health and safety guide N°30. IPCS International Programme On Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, ISBN 924154351 5.*
- Willming, M.M., Qin, G., Maul, J.D., 2013. Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2738–2745. <https://doi.org/10.1002/etc.2354>
- Zakir, A., Bengtsson, M., Sadek, M.M., Hansson, B.S., Witzgall, P., Anderson, P. (2013). Specific response to herbivore-induced *de novo* synthesized plant volatiles provide reliable information for host plant selection in a moth. *J. Exp. Biol.* jeb.083188. <https://doi.org/10.1242/jeb.083188>

# Annexes

- A. A maternal effect influences sensitivity to chlorpyrifos pesticide in the pest moth *Spodoptera littoralis* (Bagni et al. 2020).

Cette première annexe présente un article paru en 2020 dans « **Ecotoxicology and Environmental Safety** » qui traite de l'influence d'effets maternels sur la sensibilité au chlorpyrifos de larves de *Spodoptera littoralis*.

- B. Effects of low concentrations of deltamethrin are dependent on developmental stages and sexes in the pest moth *Spodoptera littoralis* (Malbert-Colas et al. 2020).

Cette deuxième annexe présente un article paru en 2020 dans « **Environmental Science and Pollution Research** » qui traite des effets de faibles doses de deltaméthrine sur *Spodoptera littoralis*.

- C. Autres activités en relation avec la thèse

## ANNEXE A

Ecotoxicology and Environmental Safety 204, 111052, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111052>

### **A maternal effect influences sensitivity to chlorpyrifos pesticide in the pest moth *Spodoptera littoralis***

*Thibaut Bagni, David Siaussat, Annick Maria, Philippe Couzi, Martine Maibèche, Manuel Massot*

Sorbonne Université, CNRS, INRAe, IRD, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, iEES-Paris, F-75005, Paris, France

#### ABSTRACT:

Transgenerational effects on sensitivity to pesticides are poorly studied. This study investigated the transgenerational influences of maternal body mass in the major pest moth *Spodoptera littoralis*, with a focus on sensitivity to chlorpyrifos pesticide. In 147 clutches of a laboratory strain of *S. littoralis*, we compared larval mortality between control larvae and larvae treated with chlorpyrifos. Because of the classic positive relationships between offspring size and maternal size and between offspring size and offspring quality, sensitivity to chlorpyrifos was predicted to be lower in larvae of larger mothers. Surprisingly, we found the opposite result, with higher pesticide toxicity in larvae of larger mothers. This result is partly explained by the lack of a relationship between larval mass and larval sensitivity to chlorpyrifos. This means that another offspring characteristic linked to maternal size should have affected larval sensitivity to chlorpyrifos. More generally, knowledge of the effects of the traits and ecological environments of mothers on offspring sensitivity to pesticides remains limited. Ecotoxicologists should pay more attention to such maternal effects on sensitivity to pesticides, both in pests and non-target species.

Keywords: Transgenerational effect, insecticide, crop insect pest, mortality, body mass, offspring size.



## 1. Introduction

The characteristics, fitness and response to environmental factors of individuals can depend on the environments experienced by their parents. These nongenetic parental effects are referred to as transgenerational effects (Latzel, 2015) and the individual variation caused by transgenerational effects can create lagged responses that are important for population dynamics (Benton et al., 2006). Consequently, transgenerational effects should be considered for the management of pest species and in risk assessment procedures on non-target species (Müller, 2018). Transgenerational mechanisms involve embryo modifications (energetic provisioning, hormones, toxins, offspring size, ...) or epigenetic alterations (DNA methylation and histone modification) (Bernardo, 1996a, 1996b; Latzel, 2015). Whether parental effects may be maternal or paternal, maternal effects are thought to be more common (Falconer and Mackay, 1996), but see Bonduriansky and Head (2007). Indeed, offspring quality often depends on maternal traits and maternal environmental history (Marshall et al., 2010; Mousseau et al., 2009; Mousseau and Fox, 1998), notably in insects (Mousseau and Dingle, 1991; Mousseau and Fox, 1998). This is especially well illustrated by a recent review of animal populations (Moore et al., 2019), which also showed that maternal effects on morphology and life-history traits in juvenile stages are especially strong.

The impact of transgenerational effects on sensitivity to pesticides is poorly studied. Most related studies are on the effects of pesticides on several generations (Brausch and Salice, 2011; Sarkar et al., 2018; Silva et al., 2019). However, studies of other transgenerational effects on pesticide sensitivity are especially scarce (Pieters and Liess, 2006; Tran et al., 2018, 2019). To the best of our knowledge, in insects, this has been investigated only in the vector mosquito *Culex pipiens* (Tran et al., 2018, 2019). The authors highlighted a synergistic effect between temperature and pesticide exposure in the parental generation that influenced the impact of chlorpyrifos pesticide on offspring survival (Tran et al., 2018). In this context, we aimed to test for a transgenerational effect on pesticide sensitivity in another insect model, the major crop pest insect *Spodoptera littoralis*, a widespread African and

Mediterranean moth: its larvae damage 87 plant species of economic importance, such as cotton, maize, and tomato, making this species one of the most destructive agricultural pests. Instead of studying the parental effects of pesticide exposure and temperature, we focused here on the effects of maternal body mass on the sensitivity of offspring to a pesticide. Indeed, maternal body size is often observed to be an influential factor for offspring quality (Marshall et al., 2010).

As in the study on the mosquito *C. pipiens*, we tested the transgenerational effect of chlorpyrifos pesticide. Chlorpyrifos is one of the most commonly used insecticides (Eaton et al., 2008), and it is indeed commonly used against the moth *S. littoralis* (Dewer et al., 2016). This organophosphate insecticide inhibits the enzyme acetylcholinesterase, which hydrolyses the neurotransmitter acetylcholine. Consequently, chlorpyrifos overstimulates the nervous system of insects, leading to their death. In *S. littoralis*, sublethal doses of chlorpyrifos have been also shown to alter metabolic pathways involved in energy production (Dewer et al., 2016). If a transgenerational effect is present as in *C. pipiens*, what effect can be predicted? Classically, offspring size is related positively to maternal body size (Lim et al., 2014). Thus, if offspring size reflects offspring quality as observed in many taxa (Allen et al., 2008; Rollinson and Hutchings, 2013), we expect sensitivity to chlorpyrifos to be lower in larvae of larger mothers. Precisely, in *S. littoralis*, we test whether the body mass of the mother influences the survival rate of her larvae when treated with chlorpyrifos.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study system and experiment

A laboratory strain of *S. littoralis* was used, with larvae reared on a semi-artificial diet (Hinks and Byers, 1976) at 23°C, 70% relative humidity, and a 16:8-h light-dark cycle until emergence. We collected and weighed adults one day after their emergence, at 7 days, in 2018 (11 and 19<sup>th</sup> of June, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> of July, 13, 14 and 15<sup>th</sup> of November). The first experimental series in June-July was performed on adults collected in our laboratory rearing where larval density was not strictly controlled. We standardized density at the fourth larval

instar visually (but without a precise count of the number of larvae in our basic laboratory routine) with density usually closes to 40-60 larvae in rearing boxes of 22.5 x 14.5 x 7.2 cm. Food was provided *ad libitum* as in all our experimental series. The second experimental series in November was performed on adults reared with strictly controlled larval density, *i.e.* with 1 *versus* 15 *versus* 40 larvae at the fourth larval instar. Except for density, all experimental conditions were the same between the two experimental series. Clutches were obtained from mating of pairs consisting of one female and one male, which were two- and three-day-old adults. Mating was performed in plastic cups (10 cm in diameter) with sugar water (20 g/L) as a food source and a strip of Whatman paper as a laying surface. We collected clutches only 24 hours after mating (at the peak of egg laying) to homogenize the sampling of eggs. We reared clutches for 8-9 days at 29°C, 70% relative humidity, and a 16:8-h light-dark cycle until the fourth larval instar was reached (L4 larvae). For each of the 201 clutches sampled, we counted the number of eggs and quantified their hatching rate. In a subsample of 147 clutches, we selected 30 L4 larvae from each clutch and weighed them before testing their sensitivity to chlorpyrifos (45395, Sigma-Pestanal, France). Although we paid attention to the time spent from the egg stage to minimize age variation when we collected L4 larvae, it cannot be ruled out that an age variation biased our measurements of larval mass. A better control of the age of larvae could have been achieved with larvae reared individually to determine more precisely their age from their third molt. However, we found that rear larvae individually had a dramatic effect in *S. littoralis* (Supplementary Material, Figure S1). Sensitivity to chlorpyrifos was tested by comparing larvae treated with chlorpyrifos and control larvae, with 15 larvae per clutch and per larval treatment. Chlorpyrifos was diluted in hexane to obtain a concentration of 44 mg/L, and control larvae were treated using hexane. We chose a chlorpyrifos concentration of 44 mg/L, which was revealed to be close to the LD50 in a preliminary test, with a larval mortality of 56% ( $N = 195$ ). Larval mortality was 58% in the present study with this concentration. We performed our treatments by topical applications of 0.5  $\mu$ L of the test solutions to the head of larvae using a microapplicator (Hamilton 25  $\mu$ L syringe and Hamilton dispenser). The mortality of larvae was checked 72 hours after treatment. We estimated larval survival rates as

the proportion of the surviving larvae tested per clutch and per treatment, *i.e.*, from samples of 15 larvae treated with chlorpyrifos and 15 control larvae.

## ***2.2. Statistical analyses***

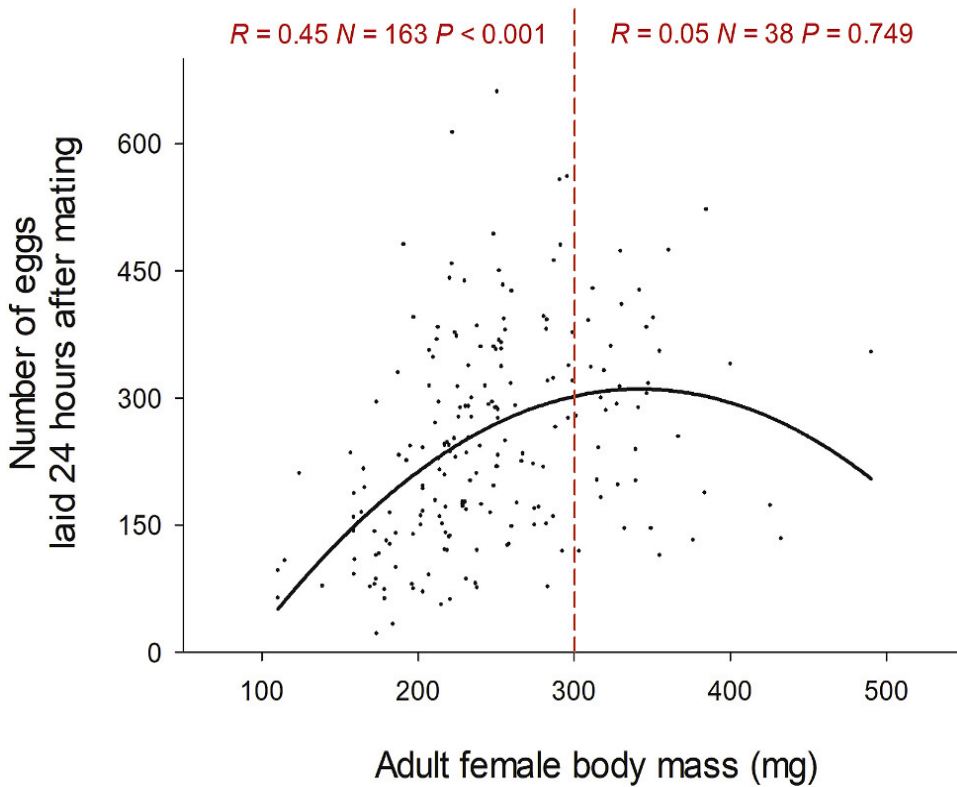
We tested the effect of maternal body mass on clutch quality (number of eggs laid 24 hours after mating and hatching success), offspring quality (larval body mass and survival rate), and offspring sensitivity to chlorpyrifos (survival rate of treated *versus* control larvae). We tested for both direct relationships between maternal body mass and these parameters and indirect effects by testing the relationships between the parameters of clutch and offspring quality. The number of eggs laid 24 hours after mating was analyzed with a regression analysis including maternal body mass and the square of maternal body mass (quadratic term to test for nonlinearity of the relationship) as factors. For hatching success, we performed logistic regressions on the frequency of clutches with high hatching success, namely, clutches with at least 90% hatched eggs. We discretized hatching success into a binomial variable because most clutches had a high success (mean hatching success of 88.7%, with 81.1% of the 201 clutches sampled having at least 90% hatched eggs). The first logistic regression included the number of eggs laid and its quadratic term as factors, and the second logistic regression included maternal body mass and its quadratic term as factors. Linear and quadratic relationships between larval body mass and maternal body mass, as well as between larval body mass and the number of eggs laid, were tested with regression analyses. Analyses were performed on the average body mass of 30 larvae per sampled clutch. For the analyses of larval survival rate, we performed analyses of covariance that included the pesticide treatment and its interaction with larval body mass or maternal body mass as additional factors. In all analyses, the full models were simplified by backward stepwise removal of terms for which  $P > 0.10$ . We checked normality of the residuals of full models in parametric analyses. Analyses were performed with JMP software (JMP Pro 15, SAS Institute Inc., USA).

### 3. Results

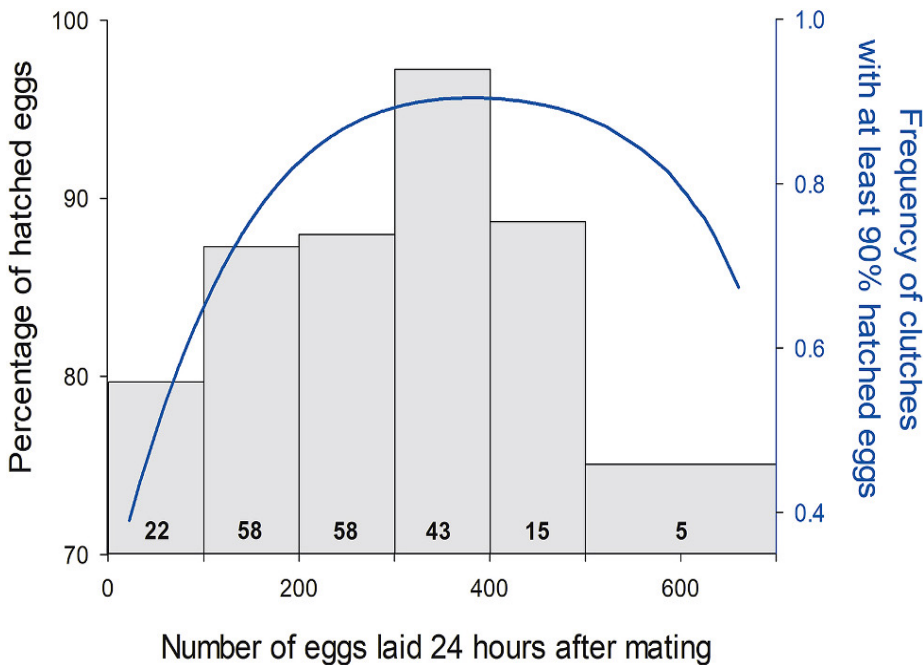
#### 3.1. Clutch parameters

We analyzed the influence of female body mass on the number of eggs laid 24 hours after mating and hatching success. We found a quadratic relationship between the number of eggs laid 24 hours after mating and female body mass ( $F_{1,198}=13.5$   $P<0.001$ ). This nonlinear relationship was clarified with partial tests for female body masses lower and higher than 300 mg (see Fig. 1). In females with a body mass lower than 300 mg (*i.e.*, in most (81%) of the females sampled), we found a positive relationship between female body mass and the number of eggs laid ( $P<0.001$ ). In the heaviest females, no significant relationship was found between female body mass and the number of eggs laid ( $P=0.749$ ). From our data of the experimental series that strictly controlled the larval density encountered by females during their ontogeny (with 1 *versus* 15 *versus* 40 larvae), we performed a complementary test on the effect of larval density on the number of eggs laid by females. The effect of larval density was tested on the residuals of the quadratic relationship with female body mass to avoid a collinearity issue. Body mass of females was indeed dependent on the larval density they encountered during ontogeny (Supplementary Material, Figure S1). In this complementary test, the number of eggs laid was not influenced by larval density ( $F_{2,113}=1.3$   $P=0.275$ ).

In the analysis of hatching success, we found a quadratic relationship between the frequency of clutches with high hatching success and the number of eggs laid ( $\chi^2_1=4.3$   $P=0.038$ ), and this relationship also fit the percentage of hatched eggs well (Fig. 2). The lowest frequencies of successful clutches and lowest hatching percentages were observed in both the smallest and largest clutches. Despite the relationship between the number of eggs laid and female body mass, hatching success was not significantly related to female body mass ( $\chi^2_1=0.5$   $P=0.494$  for the linear relationship,  $\chi^2_1=0.5$   $P=0.470$  for the quadratic relationship). Moreover, hatching success was not related to the larval density encountered by females during their ontogeny ( $\chi^2_2=3.2$   $P=0.202$ : test of the density factor in the statistical model that also included the quadratic effect of the number of eggs laid).



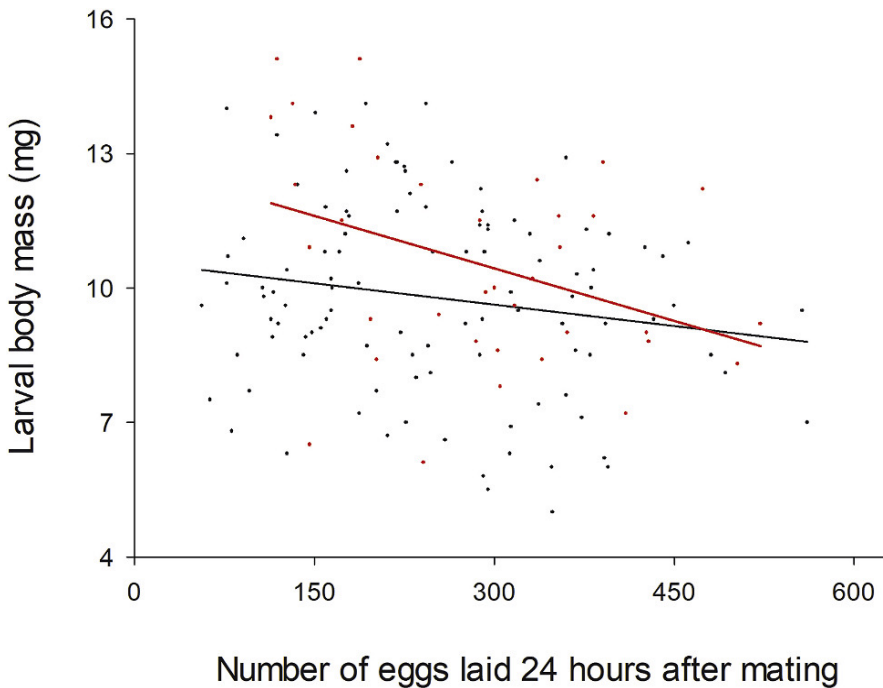
**Fig 1.** Quadratic relationship between the number of eggs laid 24 hours after mating and female body mass. The results of partial tests of females with body masses lower and higher than 300 mg are reported in red.



**Fig. 2.** Relationships between hatching success and the number of eggs laid 24 hours after mating. The histogram shows the percentage of hatched eggs, with the numbers of clutches sampled. The blue curve is the frequency of clutches with a hatching success higher than 90%.

### 3.2. Offspring traits

We analyzed the maternal influence on larval body mass and larval survival rate. Larval body mass was negatively related to the number of eggs laid (Fig. 3).

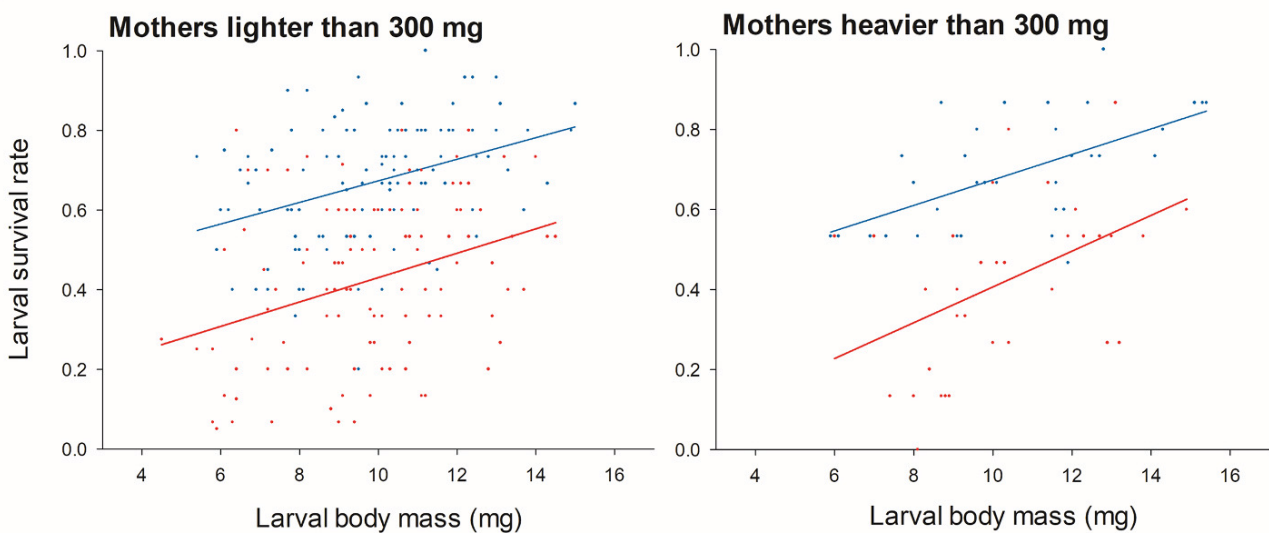


**Fig. 3.** Relationships between larval body mass and the number of eggs laid 24 hours after mating. The black points and line are for mothers with body masses lower than 300 mg, and the red points and line are for mothers with body masses higher than 300 mg.

The larger the number of eggs laid was, the lighter larvae were. This relationship was linear ( $F_{1,140}=5.8$   $P=0.017$ ), not quadratic ( $F_{1,139}=0.4$   $P=0.542$ ). The slope of the relationship did not significantly differ between the two body mass classes of mothers (lighter *versus* heavier than 300 mg as defined in Fig. 1) (Fig. 3;  $F_{1,138}=1.6$   $P=0.207$ ). This relationship coupled with the relationship between the number of eggs laid and female body mass did not result in an overall relationship between larval body mass and maternal body mass ( $F_{1,145}=2.6$   $P=0.107$  for the linear relationship,  $F_{1,144}=1.1$   $P=0.295$  for the quadratic relationship). Moreover, larval body mass was not related to the larval density encountered by mothers during their ontogeny ( $F_{2,99}=0.5$   $P=0.627$ : test of the density factor in the statistical model that also included the linear effect of the number of eggs laid). The larval and maternal masses were also not related in the mothers lighter than 300 mg ( $F_{1,109}<0.1$

$P=0.866$ ) or in the mothers heavier than 300 mg ( $F_{1,34}=0.7$   $P=0.414$ ). However, larval body mass differed between the two body mass classes of mothers. The larvae of females heavier than 300 mg were heavier than those of females lighter than 300 mg ( $F_{1,139}=4.8$   $P=0.030$ ) (Fig. 3).

In the analyses of larval survival rate, we found a positive relationship between larval body mass and survival (Fig. 4;  $F_{1,286}=51.2$   $P<0.001$ ,  $F_{1,282}<0.1$   $P=0.883$  for the quadratic relationship). The slope of this relationship did not differ between control larvae and larvae treated with chlorpyrifos ( $F_{1,283}=0.4$   $P=0.536$ ), and we observed only the expected decrease in survival in response to chlorpyrifos ( $F_{1,286}=166.7$   $P<0.001$ ) (Fig. 4). The positive relationship between larval body mass and survival was also similar between the two body mass classes of mothers ( $F_{1,284}=0.7$   $P=0.399$ ), and larval survival did not significantly differ between the two body mass classes of mothers ( $F_{1,285}=0.1$   $P=0.700$ ). In addition, larval survival was not related to the larval density encountered by mothers during their ontogeny ( $F_{2,206}=2.4$   $P=0.091$ : test of the density factor in the statistical model that also included the effects of larval body mass and chlorpyrifos).

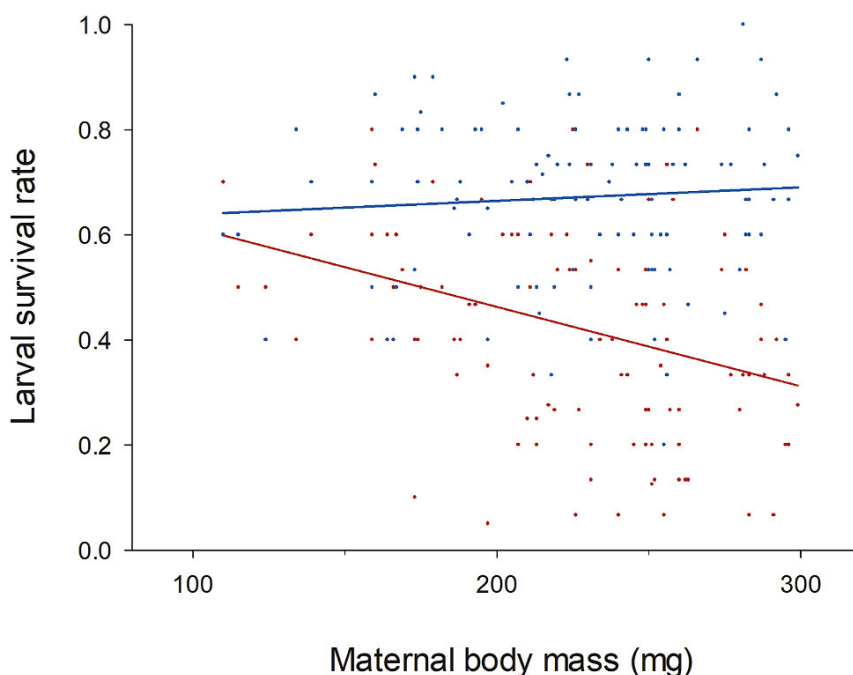


**Fig. 4.** Relationship between the larval survival rate and larval body mass in larvae of mothers lighter and heavier than 300 mg. Control larvae are in blue, and larvae treated with chlorpyrifos are in red.



### 3.3. Offspring sensitivity to chlorpyrifos

Maternal body mass influenced offspring sensitivity to chlorpyrifos for mothers with body masses less than 300 mg (Fig. 5). Indeed, we found an interaction between pesticide treatment and maternal body mass ( $F_{1,218}=11.1$   $P=0.001$ ), with a negative relationship between larval survival and maternal body mass in larvae treated with chlorpyrifos ( $F_{1,109}=13.6$   $P<0.001$ ) but not in control larvae ( $F_{1,109}=0.6$   $P=0.446$ ). Therefore, pesticide toxicity was higher in larvae of larger mothers. The relationship between larval survival and maternal body mass was linear ( $F_{1,218}=5.5$   $P=0.019$ ), not quadratic ( $F_{1,217}=0.1$   $P=0.818$ ). In the class of mothers heavier than 300 mg, we did not find a significant influence of maternal body mass ( $F_{1,69}=0.1$   $P=0.732$  for the linear effect,  $F_{1,68}=2.8$   $P=0.101$  for the quadratic effect, and  $F_{1,67}=1.6$   $P=0.210$  for the interaction with pesticide treatment).



**Fig. 5.** Relationship between larval survival rate and maternal body mass in mothers with body masses less than 300 mg. Control larvae are in blue, and larvae treated with chlorpyrifos are in red. For mothers with body masses greater than 300 mg ( $n = 36$ ), the mean survival rate  $\pm$ s.e.m. was  $0.693 \pm 0.023$  in control larvae and  $0.424 \pm 0.036$  in larvae treated with chlorpyrifos.

## 4. Discussion

Mothers often have a strong influence on the energetic provisioning of embryos and offspring size (Bernardo, 1996a, 1996b). Consequently, maternal effects are a great cause of variation in offspring morphology and life history traits, as confirmed in a recent meta-analysis (Moore et al., 2019). This was also observed in our study, with an influence of maternal body mass on larval body mass (difference between the two body mass classes of mothers, Fig. 3) and larval survival (Fig. 5). Specifically, we tested whether the sensitivity of larvae to chlorpyrifos was dependent on maternal body mass. We expected a transgenerational effect as previously observed in *C. pipiens* (Tran et al., 2018). Because offspring size (*sensu lato*, *i.e.*, also mass) is usually related positively to maternal body size (mass) (Lim et al., 2014) and offspring size usually reflects offspring quality (Allen et al., 2008; Rollinson and Hutchings, 2013), sensitivity to chlorpyrifos was expected to be lower in the larvae of heavier mothers. Surprisingly, we found the opposite result.

How can we explain this unexpected result? We must question the hypotheses of relationships between offspring mass and maternal mass and between offspring mass and offspring quality. Our unexpected result cannot be explained by an unexpected negative relationship between offspring mass and offspring quality because we found that larval mass was positively related to larval survival (Fig. 4). Finding the explanation therefore requires searching with respect to the hypothesis that offspring mass is related positively to maternal mass. Indeed, we did not find an overall relationship between offspring and maternal masses or a specific relationship between offspring and maternal mass in mothers lighter than 300 mg (81% of sampled females), in which we observed an effect on offspring sensitivity to chlorpyrifos. We found only that offspring mass differed between the two body mass classes of mothers (lighter *versus* heavier than 300 mg), but this does not explain the result of sensitivity to chlorpyrifos observed in larvae of the mothers lighter than 300 mg (Fig. 5). Therefore, larval mass did not appear to contribute to larval sensitivity to chlorpyrifos. This is also supported by the fact that the slope of relationships between larval mass and survival did not differ between control and treated larvae. The possible age

bias in our measurements of larval mass (see Materials and methods) did not seem to be an issue here because larval mass did not contribute to larval sensitivity to chlorpyrifos.

Other offspring characteristics should have been linked to maternal body mass and have contributed to the variation in larval sensitivity to the pesticide. If offspring size is a common target of maternal effects, a range of other offspring characteristics can also be influenced by maternal effects (Bernardo, 1996a; Moore et al., 2019). Indeed, maternal effects can cause offspring to differ in various ways, such as energetic provisioning, proteins, nutrients, hormones, and toxins (Wolf and Wade, 2009). In the mothers lighter than 300 mg, for which we found a maternal effect on sensitivity to chlorpyrifos, we also observed a positive relationship between the number of eggs laid and maternal body mass (Fig. 1). This higher investment in reproduction could have been performed to the detriment of egg quality because of lower energetic provisioning to embryos (Bernardo, 1996a, 1996b; Mousseau and Dingle, 1991) or any other aspect of offspring (Wolf and Wade, 2009). Indeed, such a reproductive trade-off between fecundity and offspring quality is commonly expected (Smith and Fretwell, 1974; Stearns, 1992). What could be the alternatives to this reproductive trade-off hypothesis linked to a maternal effect on offspring quality? Epigenetic alterations (DNA methylation and histone modification) in offspring related to maternal body mass are also possible (Latzel, 2015; Oppold et al., 2015), and it will be especially interesting to test for them in the future. In contrast, direct genetic covariation between maternal body mass and offspring quality is not a likely alternative because the source of variation in maternal body mass was mainly environmental in our rearing of *S. littoralis*. Indeed, we observed that adult female body mass showed rapid temporal fluctuations (Supplementary Material, Figure S2). A cause of these fluctuations was likely an effect of larval density during ontogeny because adult female body mass was negatively related to larval density (Supplementary Material, Figure S1). Because we provided food *ad libitum* in the rearing boxes to avoid global food limitation, we hypothesize that the limiting effect of larval density was an indirect effect of density on social interactions (chemical or/and behavioral interactions among larvae). Independently of the effect of larval density on adult fe-

male body mass, larval density was not found to influence the number of eggs laid by females and hatching success, and to lead to intergenerational effects on larval body mass and survival.

A small portion of ecotoxicological literature is dedicated to the impact of pesticides on several generations (Brausch and Salice, 2011; Sarkar et al., 2018; Silva et al., 2019), but studies on the transgenerational effects of other factors on sensitivity of pesticides are particularly limited. A study on the mosquito *C. pipiens* revealed an effect of the temperature experienced by the parental generation (interacting with parental pesticide exposure) on offspring sensitivity to chlorpyrifos pesticide (Tran et al., 2018). Low food availability in the parental generation in *Daphnia magna* was found to increase the size of offspring, reduce their age at first reproduction, increase their reproductive output, and decrease their sensitivity to fenvalerate pesticide (Pieters and Liess, 2006). Current knowledge of the effects of maternal traits and ecological environments on offspring sensitivity to pesticides remains limited compared to the literature dedicated to other maternal effects. The global literature on maternal effects expanded greatly over the last three decades and showed that these effects are common and affect a diversity of traits (Moore et al., 2019). Thus, we encourage ecotoxicologists to pay more attention to the impact of maternal effects on sensitivity to pesticides, both in pests and non-target organisms.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Thibaut Bagni:** Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, . **David Siauxsat:** Funding acquisition, Writing - review & editing. **Annick Maria:** Methodology. **Philippe Couzi:** Methodology. **Martine Maïbèche:** Funding acquisition, Writing - review & editing. **Manuel Massot:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing, Supervision.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Région Ile-de-France (DIM R2DS 2014).

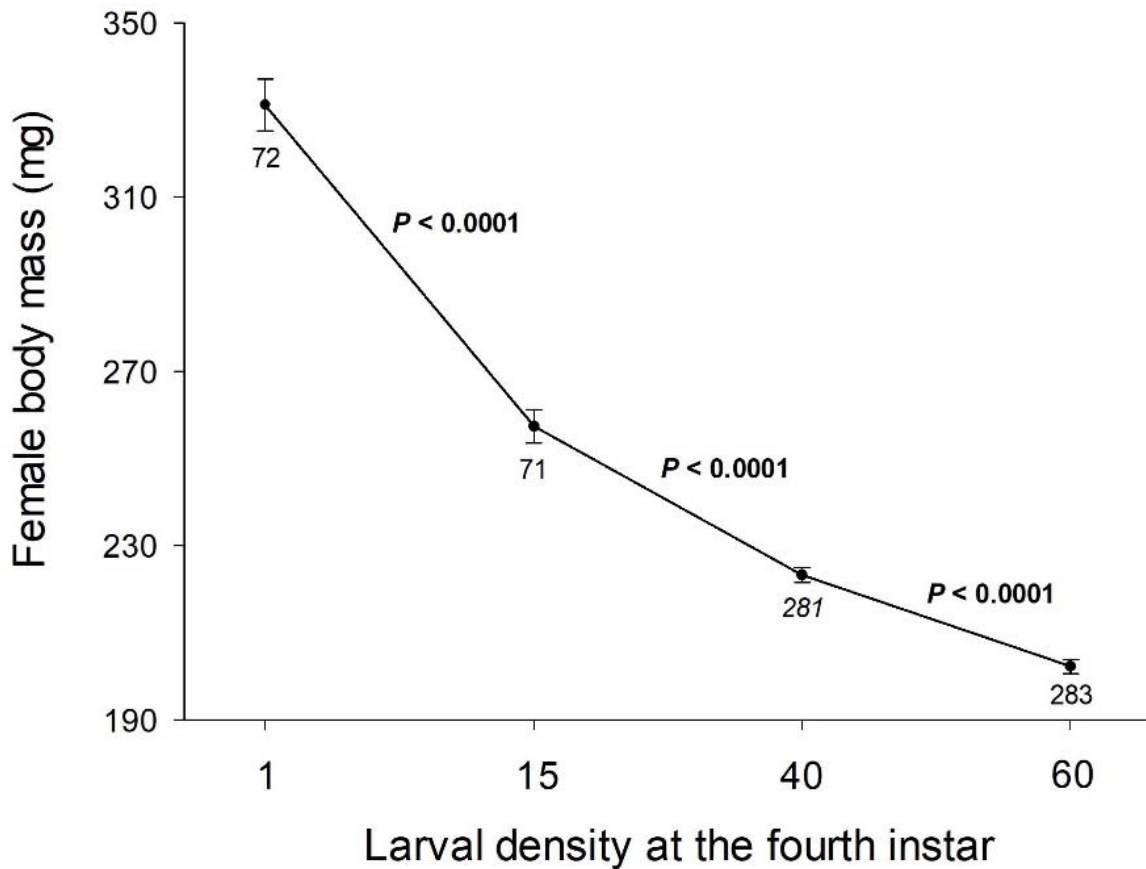
## References

- Allen, R.M., Buckley, Y.M., Marshall, D.J., 2008. Offspring size plasticity in response to intraspecific competition: an adaptive maternal effect across life-history stages. *Am. Nat.* 171, 225–237. <https://doi.org/10.1086/524952>.
- Benton, T.G., Plaistow, S.J., Coulson, T.N., 2006. Complex population dynamics and complex causation: devils, details and demography. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 1173–1181. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3495>.
- Bernardo, J., 1996a. Maternal effects in animal ecology. *Am. Zool.* 36, 83–105. <https://doi.org/10.1093/icb/36.2.83>.
- Bernardo, J., 1996b. The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: patterns, models, quality of evidence and interpretations. *Am. Zool.* 36, 216–236. <https://doi.org/10.1093/icb/36.2.216>.
- Bonduriansky, R., Head, M., 2007. Maternal and paternal condition effects on offspring phenotype in *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *J. Evol. Biol.* 20, 2379–2388. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01419.x>.
- Brausch, J.M., Salice, C.J., 2011. Effects of an environmentally realistic pesticide mixture on *Daphnia magna* exposed for two generations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 272–279. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9617-z>.
- Dewer, Y., Pottier, M.-A., Lalouette, L., Maria, A., Dacher, M., Belzunces, L.P., Kairo, G., Renault, D., Maibeche, M., Siaussat, D., 2016. Behavioral and metabolic effects of sublethal doses of two insecticides, chlorpyrifos and methomyl, in the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera litoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3086–3096. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5710-1>.
- Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Moberly, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., Spencer, P.S., 2008. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 1–125. <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to quantitative genetics, 4th ed. Longman, New York.

- Hinks, C.F., Byers, J.R., 1976. Biosystematics of the genus *Euxoa* (Lepidoptera: Noctuidae): V. Rearing procedures, and life cycles of 36 species. *Can. Entomol.* 108, 1345–1357. <https://doi.org/10.4039/Ent1081345-12>.
- Latzel, V., 2015. Pitfalls in ecological research – transgenerational effects. *Folia Geobot.* 50, 75–85. <https://doi.org/10.1007/s12224-015-9208-x>.
- Lim, J.N., Senior, A.M., Nakagawa, S., 2014. Heterogeneity in individual quality and reproductive trade-offs within species. *Evolution* 68, 2306–2318. <https://doi-org.inee.bib.cnrs.fr/10.1111/evo.12446>.
- Marshall, D.J., Heppell, S.S., Munch, S.B., Warner, R.R., 2010. The relationship between maternal phenotype and offspring quality: Do older mothers really produce the best offspring? *Ecol. Lett.* 91, 2862–2873. <https://doi.org/10.1890/09-0156.1>.
- Moore, M.P., Whiteman, H.H., Martin, R.A., 2019. A mother's legacy: the strength of maternal effects in animal populations. *Ecol. Lett.* 22, 1620–1628. <https://doi.org/10.1111/ele.13351>.
- Mousseau, T.A., Dingle, H., 1991. Maternal effects in insect life histories. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 11–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002455>.
- Mousseau, T.A., Fox, W., 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol. Evol.* 13, 403–407. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01472-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01472-4).
- Mousseau, T.A., Uller, T., Wapstra, E., Badyaev, A.V., 2009. Evolution of maternal effects: past and present. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 364, 1035–1038. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0303>.
- Müller, C. 2018. Impacts of sublethal insecticide exposure on insects - Facts and knowledge gaps. *Basic and Applied Ecology* 30, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2018.05.001>.
- Oppold, A., Kreß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J.B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegehuchte, M.B., Müller, R., 2015. Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036>.
- Pieters, B.J., Liess, M., 2006. Maternal nutritional state determines the sensitivity of *Daphnia magna* offspring to short-term Fenvalerate exposure. *Aquat. Toxicol.* 76, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.013>.
- Rollinson, N., Hutchings, J.A., 2013. The relationship between offspring size and fitness: integrating theory and empiricism. *Ecology* 94, 315–324. <https://doi.org/10.1890/2-0552.1>.

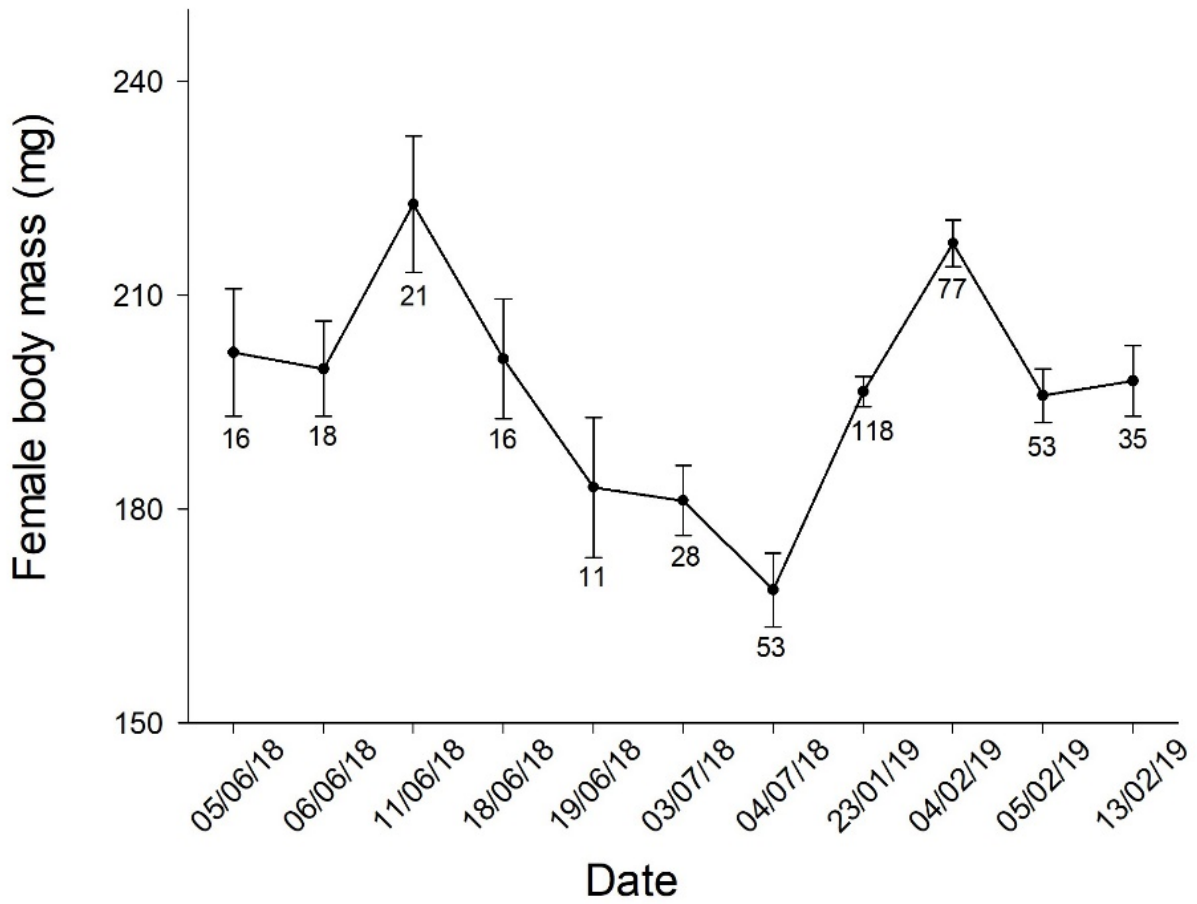
- Sarkar, S., Roy, A., Roy, S., 2018. Flubendiamide affects visual and locomotory activities of *Drosophila melanogaster* for three successive generations (P, F1 and F2). *Invert Neurosci* 18, 6–16. <https://doi.org/10.1007/s10158-018-0210-x>.
- Silva, A.R.R., Santos, C.S.A., Ferreira, N.G.C., Morgado, R., Cardoso, D.N., Cruz, A., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2019. Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*: From a subcellular to a population level. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 412–422. <https://doi.org/10.1002/etc.4307>.
- Smith, C.C., Fretwell, S.D., 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *Am. Nat.* 108, 499–506. <https://doi.org/10.1086/282929>.
- Stearns, S.C., 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Tran, T.T., Janssens, L., Dinh, K.V., Stoks, R., 2019. An adaptive transgenerational effect of warming but not of pesticide exposure determines how a pesticide and warming interact for antipredator behaviour. *Environ. Pollut.* 245, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.022>.
- Tran, T.T., Janssens, L., Dinh, K.V., Stoks, R., 2018. Transgenerational interactions between pesticide exposure and warming in a vector mosquito. *Evol. Appl.* 11, 906–917. <https://doi.org/10.1111/eva.12605>.
- Wolf, J.B., Wade, M.J., 2009. What are maternal effects (and what are they not)? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1107–1115. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0238>.

## APPENDIX A



**Figure S1.** Influence of the larval density during ontogeny on adult female body mass. Larval density was experimentally controlled at the fourth instar (1 vs 15 vs 40 vs 60 larvae per rearing box). We found a negative effect of larval density during ontogeny on female body mass. *P* values of Student's *t* tests are reported in the figure, vertical lines represent s.e.m., and the numbers indicate the sample sizes. The data with the density of 60 larvae did not appear in other analyses of the study because this experimental series was only a complementary test of the larval density effect on female body mass, *i.e.* with no measurements on female reproduction and offspring traits. In this complementary test, the density of 60 larvae was only compared to an experimental group with the density of 40 larvae.





**Figure S2.** Survey of body mass measured one day after emergence of adult females. Temporal variation was significant ( $F_{10,435}=11.0$ ,  $P<0.0001$ ). Vertical lines represent s.e.m., and the numbers reported in the figure indicate the sample sizes. We increased the sample sizes at the end of the temporal series when it became clear that the body mass of adult females was a key parameter to control in our studies.

## ANNEXE B

Environmental Science and Pollution Research 27, 41893-41901, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10181-9>

### Effects of low concentrations of deltamethrin are dependent on developmental stages and sexes in the pest moth *Spodoptera littoralis*

Aude Malbert-Colas<sup>CO</sup>, Thomas Drozd<sup>CO</sup>, Manuel Massot, Thibaut Bagni, Thomas Cher-temps, Annick Maria, Martine Maibèche, and David Siauxsat

Sorbonne Université, CNRS, INRAe, IRD, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, iEES-Paris, F-75005, Paris, France

**Abstract** – Effects of low concentrations of pesticides, with no or moderate mortality of targeted species, are poorly studied even though these low concentrations are common under natural conditions. Studying their effects is critical because they can induce positive hormetic responses, possibly leading to greater pest multiplication and promoting the evolution of pest resistance. Here, we investigated the responses of the pest moth *Spodoptera littoralis* to low concentrations of deltamethrin, and tested for variation in effects of the pesticide between developmental stages and sexes. Indeed, we show that a given concentration of deltamethrin has different effects between stages, and even between sexes. Two experimental concentrations led to very high mortality early in *S. littoralis* development (4<sup>th</sup> larval instar), but only to low mortality rates in adults. Moreover, our highest experimental concentration had only detrimental effects in adult females, but improved the reproductive success of adult males. Model projections showed that the lethality from treatments at the 4<sup>th</sup> larval instar was the predominant effect. Because of the high multiplication rate of *S. littoralis*, it was also found that treatments with very similar effects on larval mortality can lead to either population extinction or rapid pest resurgence.

#### Keywords

Pesticide, low-dose effect, hormesis, population growth rate, projection models, crop insect pest.

## Introduction

The widespread use of pesticides results in environmental pollution, biodiversity loss and the evolution of pest resistance (Casida 2009). Furthermore, in addition to the environmental nuisances and mortality of pests caused by high concentrations of insecticides, lower concentrations of pesticides can have unwanted impacts (Guedes et al. 2016, 2017). Low concentrations of pesticides associated with no or moderate mortality of targeted species can induce positive responses in exposed individuals with hormetic responses that may result in greater pest multiplication and pest resurgence, and promote evolution of pest resistance (Cutler 2013; Guedes et al. 2014). Although widely neglected, these nonlinear dose responses (biphasic response of individuals with low-dose stimulation and high-dose inhibition) are observed in all types of organisms and in response to many chemical and environmental factors (Costantini et al. 2010; Guedes et al. 2014). In the case of pesticides, low concentrations are common under natural conditions. Indeed, pesticide concentrations vary greatly over space and time because of various biotic and abiotic processes (Cutler 2013).

This variation can especially result from concentrations that decrease over time due to the progressive degradation of pesticides, and from the spread of pesticides into the environment outside treated areas. The infrequent cases of partially exposed individuals of targeted species when spraying pesticides in fields could also be considered. Indeed, while most individuals face lethal doses of pesticides when fields are treated, the small proportion of individuals facing lower doses should become a significant proportion of the few surviving individuals. In our study, we considered low concentrations of pesticides with regard to pesticide treatments in fields in order to compare the effects of the same low concentrations between different developmental stages. For a sensitive developmental stage, it is therefore possible to induce a high mortality with such low environmental concentrations. In other words, we considered low concentrations of pesticides with regard to agricultural practices, not with regard to the sublethal and lethal effects of pesticides.

Here, we focus on deltamethrin, one of the most widely used synthetic pyrethroids (WHO 1989). Pyrethroids display high efficacy against target insects and decreased toxicity to non-target vertebrates (Bradbury and Coats 1989; Goulding et al. 2013). The molecule induces toxic responses in the central and peripheral nervous systems of insects by interacting with voltage-gated sodium channels (Haug and Hoffman 1990). As a sprayed pesticide (Soderlund 2004), deltamethrin can be spread outside of treated areas. Its persistence in the environment is highly variable with half-lives ranging from 5.7 to 209 days in soil and 5.9- 17.0 days on plants (Johnson et al. 2010). However, its persistence in the environment is generally expected to be moderate as deltamethrin has a high residual activity only in protected environments. This moderate persistence limits the duration of exposure to low concentrations, but opens up the possibility for individuals close to treated fields to quickly encounter low concentrations of deltamethrin. These individuals close to treated fields may be particularly numerous at the specific time of the field treatment. Therefore, low concentrations of deltamethrin are expected for relatively short periods (1-2 weeks) after pesticide spraying in fields and areas close to the treated fields, in addition to the immediate drift of deltamethrin in areas near treated fields. As mentioned above, individuals partially exposed when spraying pesticides in fields could also be considered for exposure to low concentrations of deltamethrin.

Our research group previously found hormetic effects of deltamethrin in the moth *Spodoptera littoralis* (Lalouette et al. 2016). In this study spanning levels from genes to behaviour, it was shown that a low concentration of deltamethrin stimulates male sexual behaviour. Relationships found at the molecular level suggested that this hormetic effect was due to protection of the olfactory system by induced expression of various biotransformation enzymes (including cytochromes P450 and glutathione-S-transferases) and modulation of olfactory actors (antennal-specific carboxylesterases and odorant-binding proteins) after exposure to deltamethrin. These responses may be crucial as the olfactory system enables this moth to search for mating partners (male attraction to female-produced sex pheromone), egg-laying sites and food sources. In the present study, we expand the scope of our tests on the responses of *S. littoralis* to low concentrations of deltamethrin.

We were interested in testing the effects of deltamethrin between sexes and different developmental stages of the moth, especially because pesticide effects can vary between developmental stages (Christie and Wright 1990; Bouvier et al. 2002; Germano and Picollo 2018). We therefore conducted experimental series on fourth-stage larvae and adults. The moth traits investigated were larval mortality, adult mortality, and adult reproduction (clutch size and hatching success). We used population projection models to evaluate the relative importance of the response of the different moth traits tested. The observed responses were compared with estimates of the asymptotic growth rate obtained from a matrix modelling of the life cycle of *S. littoralis*.

## **Materials and Methods Study system**

We studied the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*, a major pest insect. The larvae of this widespread African and Mediterranean moth damage 87 plant species of economic importance such as cotton, maize, and tomato (CABI 2020), making this species one of the most destructive agricultural pests. This species can complete two to seven generations per year (Khafagi et al. 2016). Its larval development is complete with six or seven instars (depending on environmental conditions, Baker and Miller 1974), and the last two larval instars induce approximately 90 to 95% of plant defoliation (Khafagi et al. 2016). A laboratory strain of *S. littoralis* was used in our study. Larvae were reared on a semi-artificial diet (Hinks and Byers 1976) at 23°C and a 60-70% relative humidity, with a 16:8 light/dark cycle until emergence. Individuals were sexed as pupae.

## **Experiments**

The test solutions were prepared with deltamethrin (45423, Sigma Pestanal, France) diluted in a pure hexane solution (Abdullah et al. 2015; Kraikrathok et al. 2013). In each of our experimental series, these treatments were compared to a control group treated with only hexane. In preliminary tests of the study of Lalouette et al. (2016), several solvents were tested (hexane, acetone, ethanol) and only hexane had no or a very low toxicity. This is also shown in the present study with high survival rates in the control groups treated with hexane. We treated larvae at the fourth larval instar (hereafter referred as L4) to test the effects

of pesticide on larval survival rate. Topical applications of 0.5  $\mu\text{L}$  of the test solutions to the head of L4 larvae were performed using a micro-applicator (Hamilton 25  $\mu\text{L}$  syringe and Hamilton dispenser). The effect on larval survival was assessed on the basis of the survival rate until pupation, *i.e.* under a period of 13 days between the topical application applied at the beginning of the L4 stage and pupation. Treatments were also applied to two-day-old adults of both sexes to test for effects on adult survival and reproduction. We topically applied a 0.5  $\mu\text{L}$  drop to each antenna. The effect on adult survival was assessed based on the survival rate 24 hours after treatment, as in Lalouette et al. (2016). Effects on reproduction were assessed based on the number of eggs laid (collected 24 hours after mating) and hatching success. To investigate the respective sensitivities of reproduction to deltamethrin of adult females and males, and potential combined effects, we performed experiments with deltamethrin treatments applied to both parents, only females, and only males.

The choice of the route of exposure is a sensitive issue when testing the effects of pesticides because pests can be exposed through different routes (contact during pesticide spraying, contact and ingestion after pesticide treatments) and the variety of protocols is wide (*e.g.*, see <https://irac-online.org/methods/>). Our methodological choice of topical applications of deltamethrin was initially adopted to standardize our experimental treatments as much as possible. Indeed, treatments with small amounts of pesticides can be particularly sensitive to biases (*e.g.*, variation in feeding activity between experimental individuals with an ingestion method, variation in movements with a spraying on experimental surfaces). Our choice of topical applications on the antennae of adults and the head of larvae (small antennae size) was secondly based on our previous finding that a drop deposited on antennae is an effective application mode to induce hormetic effects with low concentrations of deltamethrin in *S. littoralis* (Lalouette et al. 2016). The main cause assumed for the high sensitivity of this route of exposure is that the multiporous structure of the cuticular olfactory hairs facilitates insecticide penetration into the insect body.

We selected low concentrations of deltamethrin based on recommended concentrations in fields and the previous study of adult males of *S. littoralis* (Lalouette et al. 2016).

The recommended doses of deltamethrin to treat fields are 6.25 and 35 g of active ingredients per hectare and correspond to the spraying of pure solutions (usually at 25 g/L) diluted from 500 to 3,000 fold (Chowdhury et al. 2001; Sharma et al. 2018). The insects are thus exposed just after spraying to diluted solutions approximatively from 8 to 50 mg/L. We selected the three following concentrations of deltamethrin for our tests: 0.076, 0.76 and 5.05 mg/L of deltamethrin. Although our highest concentration is close to the inferior limit of the concentration recommended for spraying, we considered it as a low environmental concentration for two reasons. First, we performed only a single topical application of the test solutions on experimental animals whereas it can be expected repeated exposures in fields. Second, our topical applications of the test solutions were performed with only the half of the solution used in Lalouette et al. (2016) where our highest concentration (5.05 mg/L) of deltamethrin induced 30% mortality in adult males.

### **Statistical analyses**

We analysed our binomial data on larval, pupal and adult survival using logistic analyses with deltamethrin treatments (including the control group) as a factor. We took sex and its interaction with the deltamethrin into account in analyses of pupal and adult survival rates. We also used logistic analyses to analyse clutch success because the hatching success of laid eggs strongly deviated from normality. We created two classes of clutch success: clutches with at least 95% of hatched eggs (135 clutches) and clutches with more than 5% of unhatched eggs (89 clutches). The value of this split was chosen to balance the sample size between the two classes. To analyse clutch success, we included treatment group (experimental treatments of both parents *versus* only females *versus* only males) and its interaction with deltamethrin as factors. We also included the factor date in the analyses. Experiments were performed on several dates for the tests of survival of L4 larvae (2 experimental dates) and adults (6 dates in females and 9 in males), and for the tests of clutch success (6 dates with both parents treated, 4 dates with females treated and 6 dates with males treated). Sample sizes per experimental date are given in Online Resource 1. In our

analyses that combined the date of experiment, sex or treatment group factor with deltamethrin, we selected models after backward elimination of independent factors for which  $P > 0.10$ .

For the analysis of the number of eggs laid, the only continuous dependent variable we analysed, we used mixed-effects linear models with deltamethrin treatment, treatment group and their interaction as fixed effects, and with the date of experiments included as a random factor (6 dates with both parents treated, 4 dates with females treated, and 6 dates with males treated). We checked the residuals of the initial model for normality and homoscedasticity, and full models were simplified by backward stepwise removal of terms for which  $P > 0.10$ .

### **Projection matrix models**

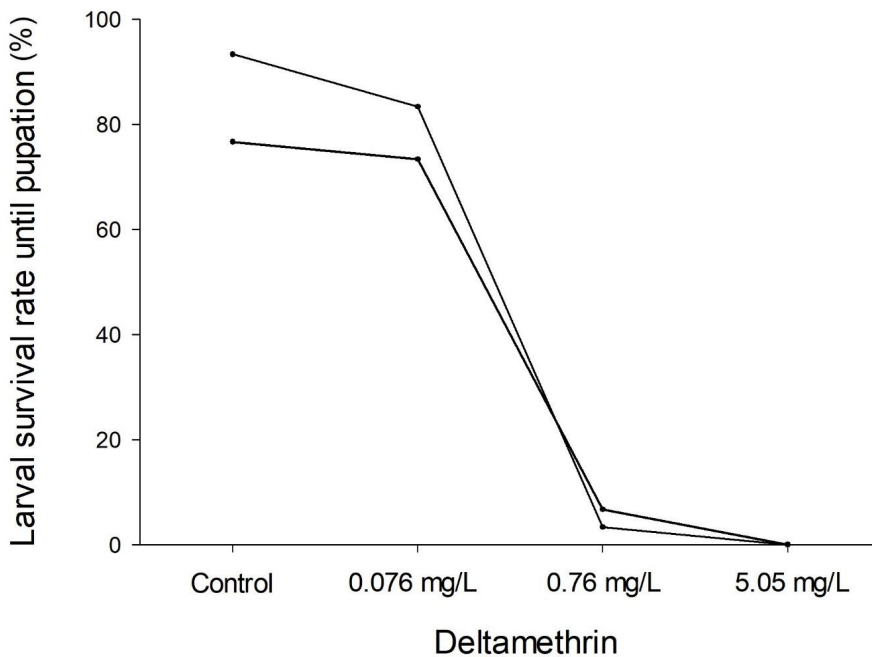
In order to evaluate the relative importance of the response of the different moth traits tested, we build matrix models to estimate the multiplication rate at the population level (Caswell 2001). Precisely, we used the asymptotic growth rate (*i.e.*, intrinsic rate of increase) as a proxy for population dynamics (Caswell 2001; Metcalf and Pavard 2007). As usual for this kind of demographic modelling, our models were based solely on females. This approach assumes that male abundance is always high enough to ensure reproduction of most females (Bessa-Gomes et al. 2010). This assumption was relevant to our study, where the sex-ratio was nearly balanced (see Online Resource 2). We modelled the life cycle of *S. littoralis* from an age-structured matrix where each age class was of 1 day, and we calculated the population growth rate as the dominant eigenvalue of the matrix. We parameterised this daily matrix model with the vital parameters estimated in the present study (survival from the fourth larval instar to pupation, pupal survival, adult female survival, laying success after mating, number of eggs laid, and hatching success). We used values obtained from a complementary study in 2017 with the same rearing conditions for survival between the first and fourth larval instars, sex-ratio, and duration of the different developmental periods. All the values used in the models are given in Online Resource 2. Our modelling was performed with the computer program ULM ('Unified Life Models') (Legendre and Clobert 1995; Ferrière et al. 1996). The ULM program can be downloaded from <http://www.biologie.ens.fr/~legendre/ulm/ulm.html>. This program enabled us to estimate the growth-rate sensitivity and elasticity (*i.e.*, relative sensitivity) to change in the different vital parameters tested (Caswell 2001; Ferrière et al. 1996).



## Results

### Larval survival rate

Figure 1 shows the mortality effect of deltamethrin on larvae treated at stage L4. Deltamethrin decreased larval survival rate until pupation ( $\chi^2_3=189.4$   $P<0.001$ ). The experimental group with the lowest concentration of deltamethrin (0.076 mg/L) did not differ from the control groups ( $\chi^2_1=0.9$   $P=0.345$ ). However, very few L4 larvae treated with the two highest concentrations of deltamethrin survived until pupation (only 3 of the 60 L4 larvae treated with 0.76 mg/L of deltamethrin, and none of the 60 L4 larvae treated with 5.05 mg/L).

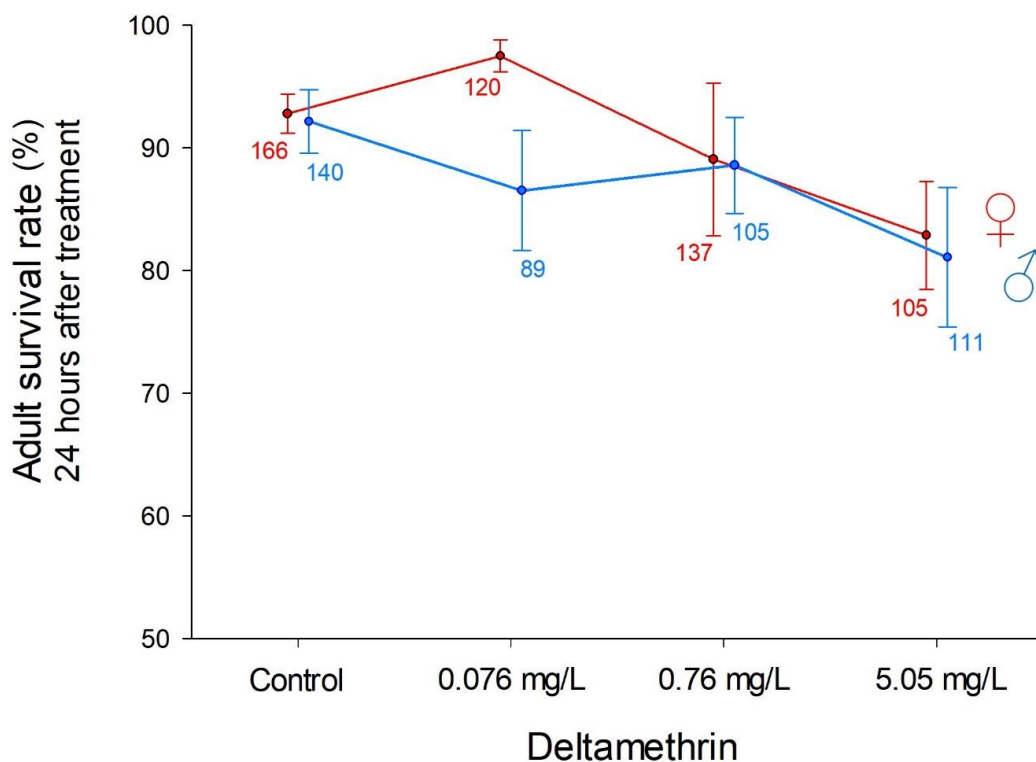


**Fig. 1** Effect of the deltamethrin treatments on the larval survival rate until pupation of the two experimental cohorts of L4 larvae; sample sizes were 30 larvae per treatment and cohort

### Adult survival rate

Because we observed variation in the adult survival rate among the experimental dates ( $\chi^2_5=15.1$   $P=0.010$  in females;  $\chi^2_8=26.3$   $P=0.001$  in males), we made a special effort to replicate our tests on the effect of deltamethrin on adults. Therefore, we performed our tests on 528 adult females on 6 experimental days, and on 445 adult males on 9 experimental

days. We found a significant effect of deltamethrin on the adult survival rate in females ( $\chi^2_3=13.5$   $P=0.004$ ) and males ( $\chi^2_3=8.5$   $P=0.036$ ). Compared to the control group, the highest concentration (5.05 mg/L) of deltamethrin decreased the adult survival rate (Fig. 2) of both females ( $\chi^2_1=6.4$   $P=0.011$ ) and males ( $\chi^2_1=6.8$   $P=0.009$ ). Adult survival did not significantly respond to the 0.76 mg/L concentration (females:  $\chi^2_1=1.3$   $P=0.258$ ; males:  $\chi^2_1=0.9$   $P=0.343$ ), or the 0.076 mg/L concentration (females:  $\chi^2_1=3.1$   $P=0.077$ ; males:  $\chi^2_1=1.9$   $P=0.167$ ).

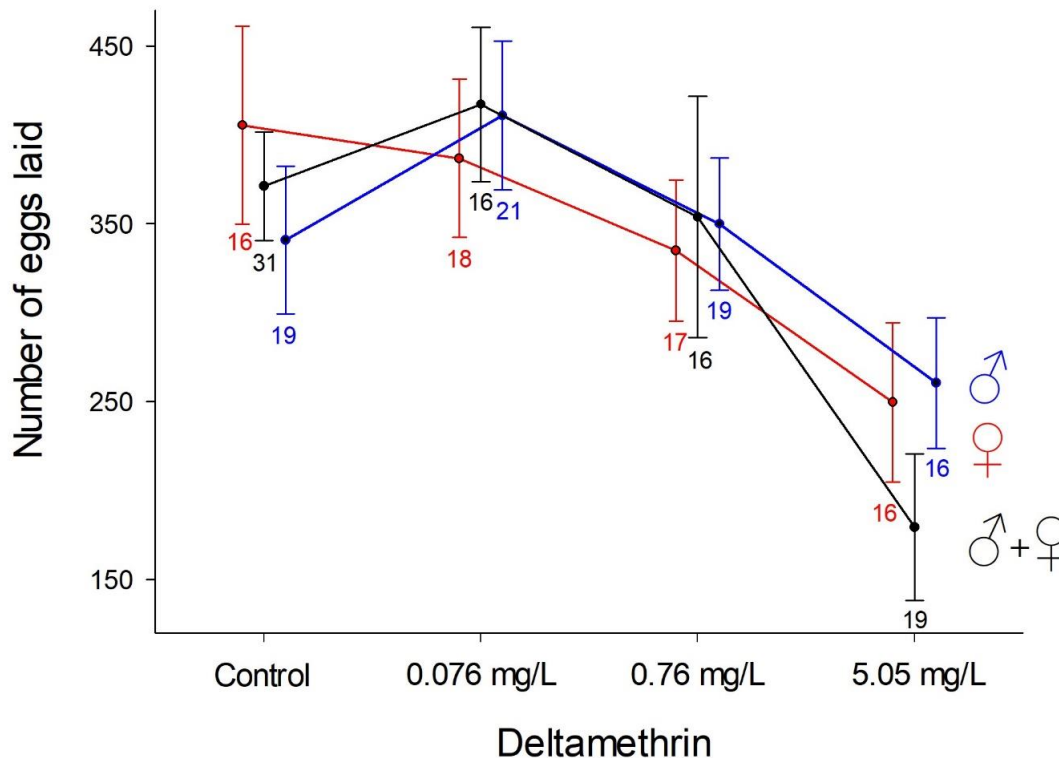


**Fig. 2** Effect of the deltamethrin treatments on the adult survival rate of males and females; the numbers indicate the sample sizes, and vertical lines represent s.e.m. between experimental replicates

### Number of eggs laid

We first analysed clutch size using a mixed-effects linear model with the deltamethrin treatment, treatment group (treatment of both parents *versus* only females *versus* only males) and their interaction as fixed effects, and the date of the experiments as a random factor. We did not find significant variation in clutch size among the dates of the experiments (Wald z- tests:  $P=0.340$  with deltamethrin applied to both parents,  $P=0.336$  for

treated females, and  $P=0.102$  for treated males). Consequently, we analysed the clutch size with ANOVA, crossing the effects of deltamethrin and treatment groups. We detected an effect of deltamethrin ( $F_{3,218}=9.2$   $P<0.001$ ), and this effect did not significantly differ among treatment groups ( $F_{6,212}=0.5$   $P=0.785$  for the interaction between deltamethrin and treatment groups). Figure 3 shows that the clutch size was decreased by the treatment with 5.05 mg/L of deltamethrin.



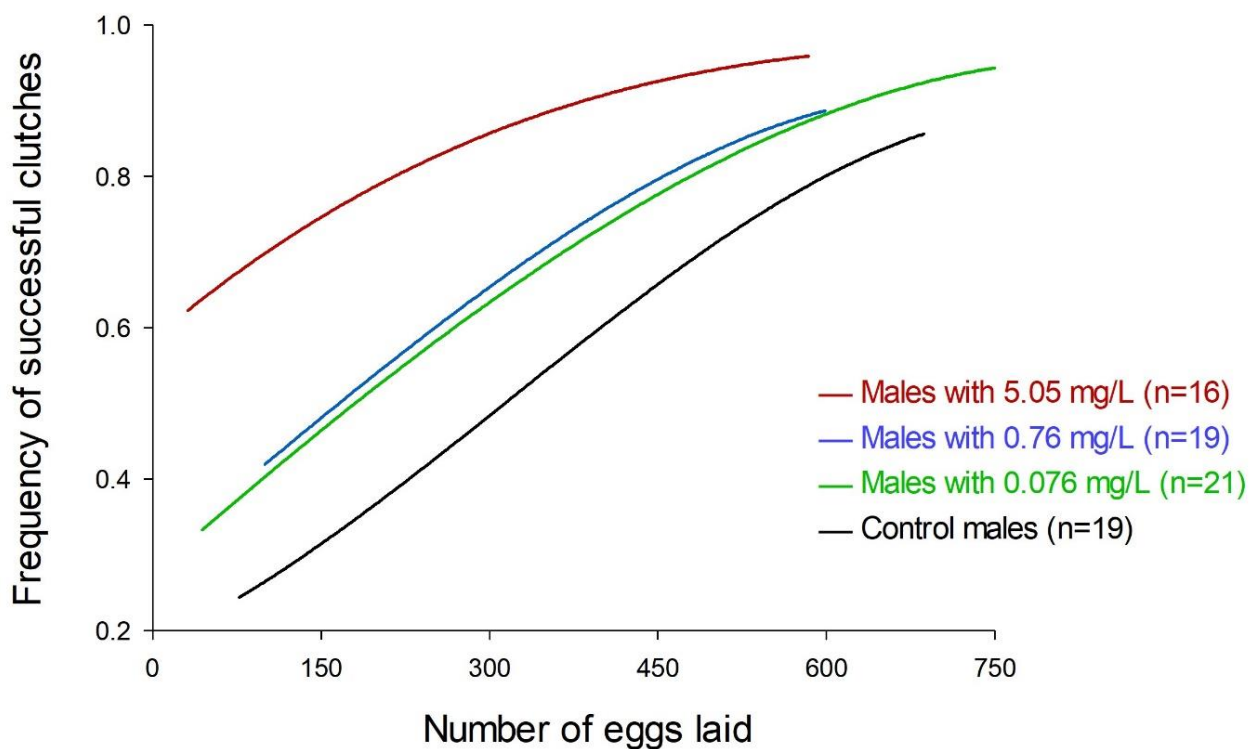
**Fig. 3** Effect of the deltamethrin treatments on clutch size in the three experimental series: treatment of both parents *versus* only females *versus* only males; the numbers indicate the sample sizes, and vertical lines represent s.e.m. between treated adults

This effect on the number of eggs laid was significant for deltamethrin applied to both parents ( $t_{48}=-87.8$   $P<0.001$ ) or to females ( $t_{30}=-9.8$   $P=0.037$ ), but not significant for deltamethrin applied to males ( $t_{33}=34.6$   $P=0.165$ ). Clutch size was not significantly influenced by the treatment with deltamethrin concentrations of 0.076 mg/L ( $P > 0.243$ ) and 0.76 mg/L ( $P > 0.306$ ) in the three treatment groups. It should be noted that the high values of s.e.m. of the number of eggs laid reported in the figure 3 were observed in another

study on *S. littoralis*, and that this variation was at least partly explained by the female body mass (unpublished data).

### Clutch success

We found that clutch success depended on clutch size ( $\chi^2_1=26.2$   $P<0.001$ ). Indeed, the larger the number of eggs laid was, the more successful the clutches were (higher frequency of clutches with at least 95% hatched eggs), as illustrated in Fig. 4 for our experimental series on the treatment of males.



**Fig. 4** Effect of the deltamethrin treatments in males on the frequency of successful clutches; the curves indicate the predicted relationships from logistic regression between clutch success (binomial variable for clutches with at least 95% hatched eggs *versus* clutches with more than 5% unhatched eggs) and clutch size

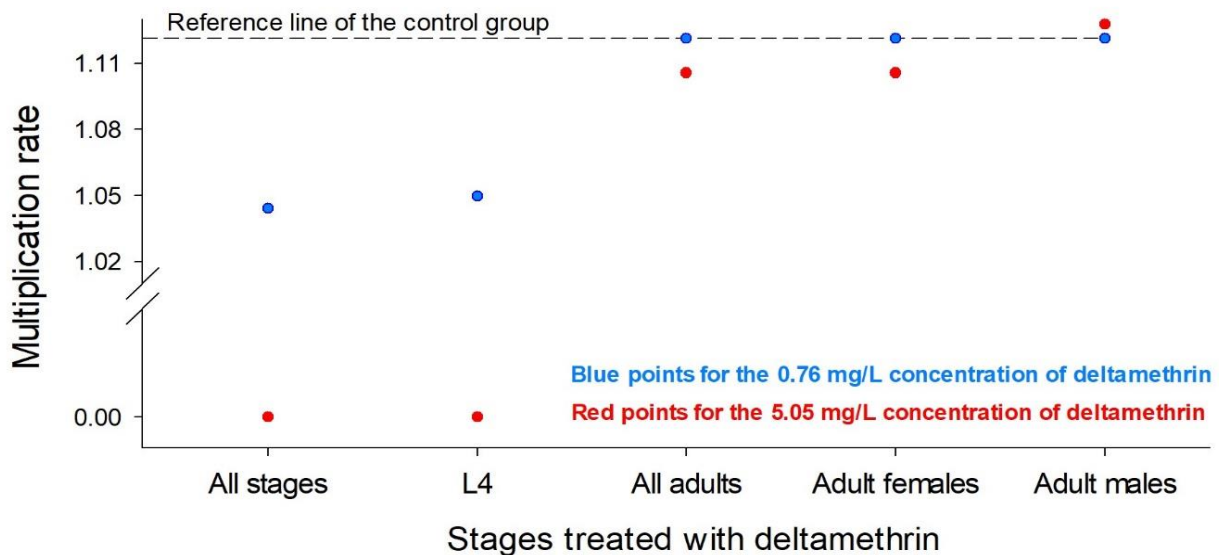
The relationship between clutch size and success did not depend on the deltamethrin treatment ( $\chi^2_3=2.5$   $P=0.476$ ) or treatment group ( $\chi^2_2=0.3$   $P=0.846$ ). However, the average effect of deltamethrin significantly differed between the treatment groups ( $\chi^2_6=13.9$   $P=0.031$ ). Indeed, we found a significant effect of deltamethrin only in experiments on

males. The males treated with the highest concentration of deltamethrin had the highest clutch success (Fig. 4;  $\chi^2_1=6.2$   $P=0.013$ ). However, the highest concentration of deltamethrin had no significant effect when applied to females ( $\chi^2_1<0.1$   $P=0.905$ ) or both to males and females ( $\chi^2_1=3.0$   $P=0.084$ ). The deltamethrin concentrations of 0.76 and 0.076 mg/L did not significantly affect the clutch success in the three treatment groups ( $P > 0.10$ ).

### Projection models

To integrate the different observed responses and evaluate their relative importance, we parameterised our models with regard to the significant effects of deltamethrin found in our experiments. The values used to fix the parameters are given in Online Resource 2. We modelled scenarios for the treatments applied specifically to the different developmental stages and sexes (L4, adult males and females, adult females only, and adult males only), and a scenario that combined the values of the treatments applied to all individuals. Because the highest concentration (5.05 mg/L) of deltamethrin applied to the L4 stage induced the mortality of all individuals (Fig. 1), it led to population extinction with a multiplication rate of 0 when applied to all stages or only the L4 stage (Fig. 5). All other scenarios resulted in a population increase (multiplication rate  $> 1$ ). However, the magnitude of the population increase differed among scenarios. Compared to the control group, the intermediate concentration of deltamethrin (0.76 mg/L) had the strongest negative impact on the multiplication rate when applied to the L4 stage, resulting also in a strong effect when applied to all stages (Fig. 5). This intermediate concentration had almost no effect on the multiplication rate when applied to the adult stage. The highest concentration (5.05 mg/L) induced weak effects when applied to the adult stages, but with a slight difference between the deltamethrin treatments of adult males and females. The higher multiplication rate in treated males was explained by their higher clutch success (Fig. 4). At the end of the spectrum of population responses to deltamethrin, the lowest concentration of deltamethrin (0.076 mg/L) did not affect the vital rates tested in our study and consequently led to the same multiplication rate as the control in all treatment scenarios.

We performed an elasticity analysis to estimate the sensitivity of the multiplication rate to proportional change in the vital rates we tested. From these relative sensitivities, the elasticity analysis allows comparison of the impact of variation in parameters of different types (Caswell 2001; Ferrière et al. 1996). The elasticity analysis shows the highest sensitivities of multiplication rate to variation in larval and pupal survival rates, and low sensitivities for adult survival and reproduction. The elasticity was 0.30 for survival from the L4 stage to pupation, 0.35 for pupal survival, 0.02 for adult survival, 0.02 for clutch size, and 0.09 for hatching success. This analysis explains that the observed effects of deltamethrin on adult survival and reproduction induced only minor responses at the population level in the treatment focused on adults (Fig. 5), despite the quite large effects of deltamethrin on clutch size (Fig. 3) and clutch success (Fig. 4). The high elasticity for survival from the L4 stage to pupation combined with the strong effect of the intermediate concentration (0.76 mg/L) of deltamethrin when applied at the L4 stage (Fig. 1) explains the strong impact at the population level of this intermediate concentration. Although this intermediate concentration and the highest concentration (5.05 mg/L) had very similar effects on the survival of L4 larvae (see Fig. 1), their impact on the population differed dramatically, with a population increase for the intermediate concentration *versus* a population extinction for the highest concentration (Fig. 5). This difference resulted from the mortality of all larvae at the highest concentration, whereas 5% of larvae survived at the intermediate concentration. Such a qualitative difference in larval mortality is relevant in the context of pest management because the survival of a few individuals of a species with a high multiplication rate, such as *S. littoralis*, is enough to lead to a quick resurgence of pest populations (see Online Resource 3 for projections obtained from the values of vital parameters estimated in the control group).



**Fig. 5** Effect of deltamethrin on the multiplication rate of simulated populations with the combined values resulting from the experimental treatments at all stages and from the treatments applied specifically to the different developmental stages and sexes; the lowest concentration (0.076 mg/L) of deltamethrin is not shown because it did not cause significant differences compared to the control group

## Discussion

We report variation in the effects of deltamethrin between larvae and adults of *S. littoralis*. Deltamethrin is mainly used against the larval stages of *S. littoralis* in order to fight the pest as soon as possible (Riskallah 1980; Miles and Lysandrou 2002). However, adults are simultaneously affected by the pesticide when different overlapping generations are present in the treated field or areas closed to the treated field. Our study stressed that low environmental concentrations of deltamethrin can have major effects. Indeed, we found that even our intermediate concentration (0.76 mg/L) of deltamethrin led to very high mortality early in the development of *S. littoralis*, at its fourth larval instar. By contrast, our highest concentration (5.05 mg/L) of deltamethrin induced only low mortality rates in adults. Interestingly, the highest concentration was detrimental to clutch size but beneficial to the reproductive success of adult males. To summarize, our results show that a particular concentration of pesticide can have different effects depending on individuals in terms of the magnitude of the responses as well as their direction (detrimental *versus* beneficial). Furthermore, the significance of the observed responses at the population level was highly

variable. Our model projections emphasize the prominent influence of effects at early developmental stages, and show also the narrow limit of these early effects leading to either population extinction or population growth.

The early developmental stage studied (the fourth larval instar) was more sensitive to deltamethrin than the adult stage (Fig. 1, 2 and 5). There are three possible causes for this difference: (i) the quantity of pesticide applied to individuals was a function of their body mass, (ii) developmental stages differed in their sensitivity to pesticides, and (iii) the duration considered to test the effects of treatments differed between stages depending on the variables measured. The first explanation related to variation in body mass is likely relevant because body mass differs greatly among stages. Average dry weight is 1.5 mg in L4 larvae, 47.9 mg in adult males, and 63.2 mg in adult females (estimates obtained from live body mass measured in several experimental series on 1256 L4 larvae, 169 adult males and 163 adult females, and using stage-specific ratios between live and dry weight). Thus, L4 larvae were 32 times lighter than adult males, and 42 times lighter than adult females. We accounted for only a small part of the variation between L4 larvae and adults in our treatments by applying 2 times less of experimental solution to larvae than to adults (0.5  $\mu$ L per larva *versus* 1  $\mu$ L per adult). Consequently, the amount of deltamethrin provided per insect was 16 times higher in L4 larvae than adult males and 21 times higher in L4 larvae than adult females, and should be the main cause of the strongest response observed in L4 larvae. However, the second possibility remains open, with developmental stages that differed in their sensitivity to deltamethrin. Indeed, age dependence on the toxicity of another pesticide (abamectin) between larval instars of *S. littoralis* was previously observed (Christie and Wright 1990). The suggested mechanisms were age variation in cuticular penetration and metabolic processes. Moreover, the age dependence in response to deltamethrin in another moth species, the codling moth *Cydia pomonella*, was considered as part of explanation of the evolution of deltamethrin resistance (Bouvier et al. 2002). The third explanation related to the duration considered to test the effects of treatments can be rejected. The large difference in duration between our larval and adult treatments (13 days for L4 larvae *versus* only 24 hours for adults) is indeed not a concern because the response



of larvae to deltamethrin is very rapid (Online Resource 4). In this complementary experiment, high mortality in response to deltamethrin was observed for our highest concentration of 5.05 mg/L, but not for the intermediate concentration of 0.76 mg/L (Online Resource 4). This difference with our previous result (Fig. 1) shows that the limit between high and low mortality effects on L4 larvae is very close to a deltamethrin concentration of 0.76 mg/L.

Low concentrations of pesticides are more and more studied because they are common outside the treated areas and inside these areas after high lethal concentrations decline with degradation (Cutler 2013). The infrequent cases of individuals partially exposed during pesticide spraying in fields might also to be considered as they could be a significant part of the few individuals surviving to pesticide treatments. Even if low lethal concentrations are less influential on population dynamics than high lethal concentrations in the short-term, they may lead to greater pest multiplication later because they can promote hormetic responses with the stimulation of exposed individuals (Cutler 2013; Guedes et al. 2014). Concerning deltamethrin specifically, low concentrations can influence the reproduction of pest insects (Cutler 2013; Lee et al. 1998; Yang and Du 2003), especially in males of *S. littoralis* (Lalouette et al. 2016). Here, we also found effects of deltamethrin on reproduction, but with a difference between males and females. The effect of our highest concentration of deltamethrin (5.05 mg/L) was detrimental to the clutch size produced by females, but beneficial to the clutch success of males. This concentration of deltamethrin is considered a low lethal concentration in adults because more than 80% of adults survived in this treatment (Fig. 2). Consequently, the beneficial response of clutch success of adult males to the 5.05 mg/L concentration might be a hormetic response.

In *S. littoralis*, a hormetic effect on male sexual behaviour was previously found (Lalouette et al. 2016), but for our intermediate concentration (0.76 mg/L). The lower concentration needed to detect this hormetic effect might be explained by the high sensitivity of behaviours to toxicants (Gerhardt 2007). To be considered hormetic, the response of in-

dividuals has to be biphasic, with low-dose stimulation and high-dose inhibition (Costantini et al. 2010; Guedes et al. 2014). Male sexual behaviour was indeed stimulated by the 0.76 mg/L concentration and inhibited by the 5.05 mg/L concentration. Concerning the clutch success of males, we do not know if the stimulation by the 5.05 mg/L concentration is coupled with an inhibition by a higher concentration. If the response of clutch success is not biphasic, an alternative hypothesis to hormesis is that the stimulation of clutch success by deltamethrin results from an adaptive response of males to the decrease in their survival (Fig. 2). Indeed, a shortening of life expectancy can induce terminal investment in reproduction (Stearns 1992), which might be a fertility insurance response of males to improve their clutch success. This kind of response is expected when males have multiple reproductions, as observed in males of *S. littoralis* which can mate five times on average (Kehat and Gordon 1975). Because Kehat and Gordon estimated that females mate only two times on average, improving their clutch success in response to the decrease in their survival would not be very beneficial, which might explain the lack of stimulation of their clutch success by deltamethrin.

Although insufficiently used, population modelling in ecotoxicology is increasingly advised as a way to translate responses from individuals to the population level (Köhler and Triebkorn 2013; Moe et al. 2013). Here, our models showed that the different vital parameters do not impact populations similarly, and that *S. littoralis* is mostly affected by the pesticide early in development. As a consequence, even our intermediate concentration of deltamethrin is sufficient to have a large effect at the population level. Another lesson of our projection models is that pesticide treatments with nearly lethal effects can lead to either population extinction or pest resurgence. In our experiments, the limit between these two extreme responses resulted from a qualitative difference, namely, that the pesticide treatment killed either all or almost all individuals. This result is not that surprising for *S. littoralis*, for which we estimated that one to five clutches are sufficient to produce between 200 and 1,300 L4 larvae (Online Resource 3) some days later: 13 days at our experimental temperature of 23°C, 10 days at 25°C, 9 days at 27°C, or 8 days at 29°C (unpublished data). In the next generation, the number of L4 larvae will be between 10,000 and 80,000 (Online

Resource 3), *i.e.*, 41 days later at 23°C, 34 days later at 25°C, 29 days later at 27°C, and only 27 days later at 29°C.

The next step in our study will be to investigate the influence of temperature on the effects of deltamethrin. Indeed, Riskallah (1984) found that deltamethrin is more toxic to larvae (at the fourth instar L4) at 20°C than at 35°C. We aim to investigate this response along a thermal gradient because of the non-linearity of most biological responses to temperature (Sinclair et al. 2016). It is crucial to study the interaction between pesticides and temperature in the context of global climate change (Hooper et al. 2013), and also to develop predictive insect population models that consider multiple factors simultaneously (Bewick 2016). We also aim to compare different routes of pesticides exposure (topical applications on antenna, proboscis, abdomen and tarsus) that is a sensitive point to investigate the impact of pesticides.

## References

- Abdullah F, Subramanian P, Ibrahim H, Abdul Malek SN, Lee GS, Hong SL (2015) Chemical composition, antifeedant, repellent, and toxicity activities of the rhizomes of Galangal, *Alpinia galanga* against asian subterranean termites, *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Insect Science* 15:1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu175>
- Baker CRB, Miller GW (1974) Some effects of temperature and larval food on development of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae). *B Entomol Res* 63:495-511
- Bessa-Gomes C, Legendre S, Clobert J (2010) Discrete two-sex models of population dynamics: On modelling the mating function. *Acta Oecol* 36:439-445. <https://doi.org.inee.bib.cnrs.fr/10.1016/j.actao.2010.02.010>
- Bewick S (2016) Current and future challenges of predictive insect population modelling. *Funct Ecol* 30:1028-1029. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12678>
- Bouvier JC, Boivin T, Beslay D, Sauphanor B (2002) Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch Insect Biochem* 51:55-66. <https://doi.org/10.1002/arch.10052>
- Bradbury SP, Coats JR (1989) Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environ Toxicol Chem* 8:373-380

- CABI (2020) *Spodoptera littoralis* (cotton leafworm). In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/51070>
- Casida JE (2009) Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem Res Toxicol* 22:609-619. <https://doi.org/10.1021/tx8004949>
- Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ (1983) Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann Rev Pharmacol* 23:413-438
- Caswell H (2001) *Matrix Population Models: construction, analysis, and interpretation*. Sinauer Associates Inc. (2nd edition), Sunderland
- Chowdhury ABMNU, Jepson PC, Howse PE, Ford MG (2001) Leaf surfaces and the bioavailability of pesticide residues. *Pest Manag Sci* 57:403-412. <https://doi.org/10.1002/ps.311>
- Christie PT, Wright DJ (1990) Activity of abamectin against larval stages of *Spodoptera littoralis* boisduval and *Heliothis armigera* hübner (Lepidoptera: Noctuidae) and possible mechanisms determining differential toxicity. *Pestic Sci* 29:29-38
- Costantini D, Metcalfe NB, Monaghan P (2010) Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol Lett* 13:1435-1447. <https://doi.org/10.1111/j.14610248.2010.01531.x>
- Cutler GC (2013) Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose- Response* 11:154-177. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008.Cutler>
- Delpuech JM, Dupont C, Allemand R (2012) Effects of deltamethrin on the specific discrimination of sex pheromones in two sympatric *Trichogramma* species. *Ecotox Environ Safe* 84:32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.007>
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81-106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Ferrière R, F Sarrazin, S Legendre, J-P Baron (1996) Matrix population models applied to viability analysis and conservation: Theory and practice with ULM software. *Acta OEcol* 17:629-6356
- Gerhardt A (2007) Aquatic behavioral ecotoxicology-prospects and limitations. *Hum Ecol Risk Assess* 13:481-491. <https://doi.org/10.1080/10807030701340839>
- Germano MD, Picollo MI (2018) Stage-dependent expression of deltamethrin toxicity and resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *J Med Entomol* XX:1-5. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy017>
- Goulding AT, Shelley LK, Ross PS, Kennedy CJ (2013) Reduction in swimming performance in

- juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. *Comp Biochem Phys C* 157:280-286.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.01.001>
- Guedes RNC, Cutler GC (2014) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management: insecticide-induced hormesis. *Pest Manag Sci* 70:690–697. <https://doi.org/10.1002/ps.3669>
- Guedes RNC, Smaghe G, Stark JD, Desneux N (2016) Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annu Rev Entomol* 61:43– 62.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023646>
- Guedes RNC, Walse SS, Throne JE (2017) Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. *Curr Opin Insect Sci*, 21:47–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.010>
- Haug G, Hoffman H (1990) *Chemistry of Plant Protection 4: Synthetic pyrethroid insecticides: structures and properties*. Springer, New York
- Hinks CF, Byers JR (1976) Biosystematics of the genus *Euxoa* (Lepidoptera: Noctuidae). V. Rearing procedures and life cycles of 36 species. *Can Entomol* 108:1345-1357
- Hooper MJ, Ankley GT, Cristol DA, Maryoung LA, Noyes PD, Pinkerton KE (2013) Interactions between chemical and climate stressors: A role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. *Environ Toxicol Chem* 32:32-48. <https://doi.org/10.1002/etc.2043>
- Johnson M, Luukinen B, Buhl K, Stone D (2010) Deltamethrin Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/Deltatech.html>
- Kehat M, Gordon D (1975) Mating, longevity, fertility and fecundity of the cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidea). *Phytoparasitica* 3:87-102
- Khafagi WE, Hegazi EM, Amer NA (2016) Effects of temperature on the development, food consumption and utilization parameters of the last two larval instars of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *J Agric Sci Technol* 2:93-99
- Köhler HR, Triebkorn R (2013) Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341:759-765.  
<https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Kraikrathok C, Ngamsaeng S, Bullangpoti V, Pluempanupat W, Koul O (2013) Bio efficacy of some Piperaceae plant extracts against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Comm Appl Biol Sci* 78:305–309

- Lalouette L, Pottier MA, Wycke MA, Boitard C, Bozzolan F, Maria A, Demondion E, Chertemps T, Lucas P, Renault D, Maibeche M, Siauxsat D (2016) Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environ Sci Pollut R* 23:3073-3085. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5923-3>
- Lee CY, Yap HH, Chong NL (1998) Sublethal effects of deltamethrin and propoxur on longevity and reproduction of German cockroaches, *Blattella germanica*. *Entomol Exp Appl* 89:137-145. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00392.x>
- Legendre S, Clobert J (1995) ULM, a software for conservation and evolutionary biologists. *J Appl Stat* 22:817-834
- Metcalf CJE, Pavard S (2007) Why evolutionary biologists should be demographers. *Trends Ecol Evol* 22:205-212. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.12.001>
- Miles M, Lysandrou M (2002) Evidence for negative cross resistance to insecticides in field collected *Spodoptera littoralis* (Boisd.) from Lebanon in laboratory bioassays. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 67:665-669
- Moe SJ, De Schampelaere K, Clements WH, Sorensen MT, Van den Brink PJ, Liess M (2013) Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities. *Environ Toxicol Chem* 32:49-61. <https://doi.org/10.1002/etc.2045>
- Riskallah MR (1980) Reduced sensitivity of cholinesterase as a factor of resistance in leptophos selected strain in the Egyptian cotton leafworm. *J Environ Sci Heal B* 15:181-92
- Riskallah MR (1984) Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides to susceptible and resistant larvae of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Experientia* 40:188-190
- Sgolastra F, Arnan X, Cabbri R, Isani G, Medrzycki P, Teper, D, Bosch, J (2018) Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. *P Roy Soc B-Biol Sci* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0887>
- Sharma N, Banerjee H, Pal S, Sharma KK (2018) Persistence of thiacloprid and deltamethrin residues in tea grown at different locations of North-East India. *Food Chem* 253:88- 92. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.132>
- Sinclair BJ, Marshall KE, Sewell MA, Levesque DL, Willett CS, Slotsbo S, Dong Y, Harley CDG, Marshall DJ, Helmuth BS, and Huey RB (2016) Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecol Lett*

19:1372-1385. <https://doi.org/10.1111/ele.12686>

Soderlund DM (2004) Pyrethroids and sodium channels. In: Beadle DJ, Mellor IR, Usherwood PNR (eds). Neurotox' 03: neurotoxicological targets from functional genomics and proteomics. Society of Chemical Industry, London, p 79e86

Stearns SC (1992) The Evolution of Life Histories. Oxford University Press, Oxford

WHO (1989) Deltamethrin health and safety guide N°30. IPCS International Programme On Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, ISBN 924154351 5

Yang ZH, Du JW (2003) Effects of sublethal deltamethrin on the chemical communication system and PBAN activity of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Güenee). J Chem Ecol 29:1611-1619. <https://doi-org.inee.bib.cnrs.fr/10.1023/A:1024222830332>

**ESM 1.** Sample sizes for the four deltamethrin treatments in experimental series performed on survival of L4 larvae, adult survival, and reproduction (number of eggs laid, clutch success). The numbers in the table indicate the sample size of the different experimental dates.

<b>Experimental series</b>	<b>Deltamethrin treatments</b>			
	<b>Control</b>	<b>0.076 mg/L</b>	<b>0.76 mg/L</b>	<b>5.05 mg/L</b>
Survival of L4 larvae	30, 30	30, 30	30, 30	30, 30
Survival of adult females	24, 25, 48, 35, 22, 12	24, 27, 35, 20, 14, 0	24, 10, 54, 35, 14, 0	28, 10, 10, 20, 22, 15
Survival of adult males	15, 16, 19, 17, 21, 21, 17, 7, 7	15, 17, 6, 6, 4, 10, 17, 7, 7	14, 4, 23, 17, 6, 10, 17, 7, 7	17, 4, 6, 10, 24, 19, 17, 7, 7
Reproduction with both parents treated	4, 7, 10, 4, 3, 3	4, 6, 0, 0, 0, 6	4, 0, 8, 0, 0, 4	4, 0, 0, 7, 8, 0
Reproduction with females treated	4, 4, 4, 4	5, 5, 4, 4	6, 3, 4, 4	6, 4, 3, 3
Reproduction with males treated	3, 2, 4, 3, 4, 3	4, 3, 5, 1, 3, 5	2, 2, 5, 4, 3, 3	1, 1, 4, 3, 2, 5

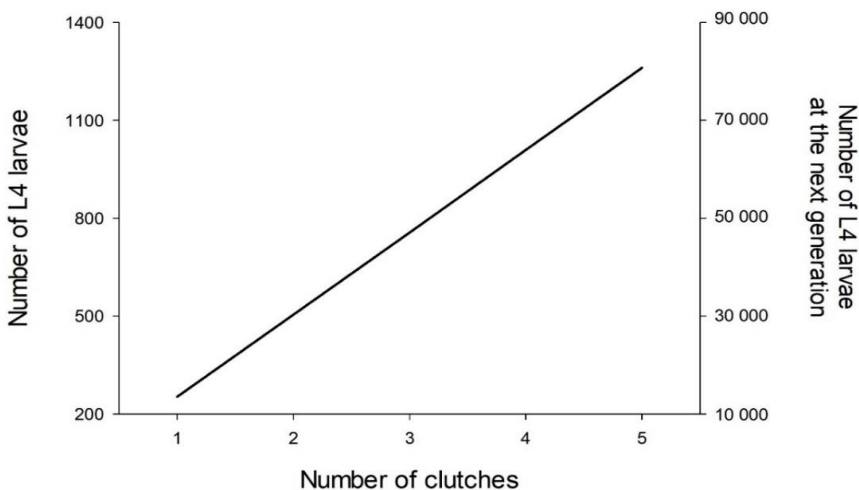


**ESM 2.** Values of the parameters used in matrix models. The values reported in bold are for the significant responses to deltamethrin we found, and for which we modelled values that differed from the control group. For the hatching success, we performed the model with the specific value we estimated for the 5.05 mg/L concentration of deltamethrin applied only to males (value in bold), and also the models with no significant effect of deltamethrin for the cases with the treatment applied to females or both sexes.

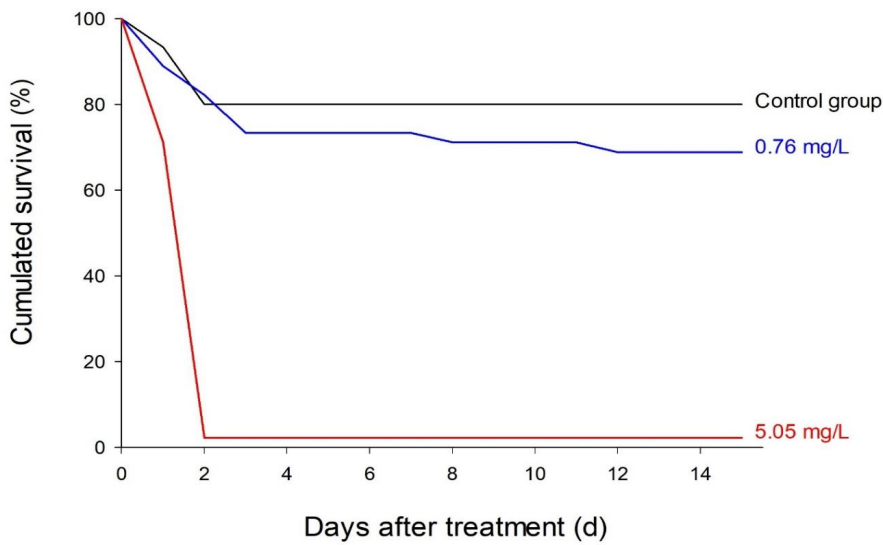
<b>Deltamethrin treatment</b>	<b>Control</b>	<b>0.076 mg/L</b>	<b>0.76 mg/L</b>	<b>5.05 mg/L</b>
Survival from L4 to pupation (%)	85.0	85.0	<b>5.0</b>	<b>0.0</b>
Pupal survival (%)	96.7	96.7	<b>76.9</b>	<b>74.1</b>
Adult female survival (%)	92.8	92.8	92.8	<b>82.9</b>
Number of eggs laid	371	371	371	<b>227</b>
Hatching success (%)	71.3	71.3	71.3	71.3 or <b>91.1</b>

For other parameters used in models, their values were obtained in a complementary study (spring 2017): 68.0 % of larval survival from L1 to L4 stages, sex-ratio with 47.1 % of females, 78.3 % of laying after mating, duration of 4 days for the incubation period, duration of 9 days for the period from L1 to L4 stages, duration of 13 days for the period between L4 stage and pupation, and duration of 15 days for the pupal period.

**ESM 3.** Relationship between the number of clutches and the numbers of L4 larvae at the first and second generation (same relationship but respectively for the scales at left and right). These projections were performed from the values of vital parameters reported for the control group in the Table ESM 1 (Online Resource 1).



**ESM 4.** Effect of the deltamethrin treatments over time on the cumulative percentage of surviving larvae from L4 stage to pupation. Sample sizes were of 45 larvae for each treatment (control group, concentrations 0.76 and 5.05 mg/L of deltamethrin) applied to the fourth larval stage. This experiment was performed in February 2019 in the same laboratory conditions (temperature, humidity, food, larval density) than the main experimental series. If the curve of the 0.76 mg/L concentration did not significantly differ from the control group (Wilcoxon test:  $\chi^2_1=1.0$   $P=0.312$ ), a significant difference was found between the control group and the 5.05 mg/L concentration ( $\chi^2_1=46.7$   $P<0.0001$ ). This effect of the highest concentration of deltamethrin took effect in less than 2 days.



# ANNEXE C. Autres activités en relation avec la thèse

## Encadrement :

Clémentine Labbé, Master 1 Ecophysiologie, écotoxicologie (Sorbonne université)  
 Avril 2020 - Juin 2020 / Réalisation d'un mémoire bibliographique et d'un poster.



Master BEE / EPET  
 Biodiversité, Ecologie,  
 Evolution  
 M1 2019-2020

## Etude des maximales thermiques chez le ravageur de culture *Spodoptera Littoralis*



**LABBE Clémentine**, Massot Manuel, Bagni Thibaut  
 iEES Paris, UMR 7618 Ecologie sensorielle, Equipe chimio réception et adaptation



### 1 Cadre conceptuel

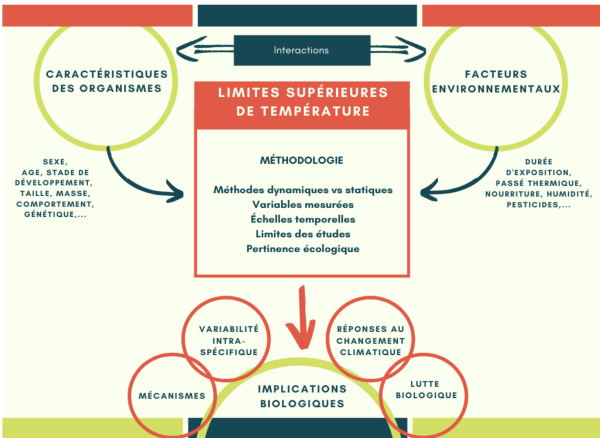


Figure 1 : Schéma récapitulatif de détermination des maximales thermiques chez une espèce

### 2 Objectif de l'étude

Principaux éléments à considérer pour l'étude des limites supérieures de température chez la noctuelle du coton *Spodoptera littoralis* sur la base d'une synthèse bibliographique (67 publications consultées)

### 3 Matériels & Méthodes

- Etablissement du paysage thermique selon la température et la durée d'exposition (Rezende et al., 2014)

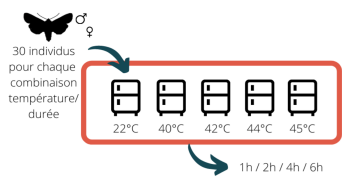


Figure 2 : Exemple de protocole selon Rusch et al., 2019

- Utilisation d'enceintes contrôlant la température et l'humidité
- Vitesse d'augmentation de la température avec pertinence écologique
- Comparaison méthode dynamique vs statique (Piyaphongkul et al. 2012)
- Mesures proposées : comportement (activité, accouplements), physiologie (spasmes, HSP), fertilité des adultes, mortalité
- Prise en compte du sexe, stade de développement, taille

### 4 Exemples de résultats attendus

#### Paysage thermique

L'impact d'un stress dépend à la fois de sa durée et de son intensité

- une seule température est trop simpliste pour décrire la limitation thermique supérieure d'une espèce
- notion de paysage de tolérance (Fig. 3) avec prise en compte de la durée d'exposition

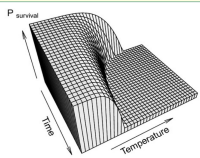


Figure 3 : Représentation du paysage de tolérance thermique d'après Rezende et al., 2014

#### Influence de caractéristiques des organismes

Détermination de LT99 (ou autre seuil) : temps entraînant 99% de mortalité à une température donnée (Fig. 5)

- diminution du LT99 avec la température
- différence selon les stades de développement

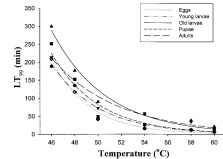


Figure 5 : LT99 chez *T.confusum*, Boina et Subramanyam, 2004

#### Influence de facteurs environnementaux

Détermination de CTmax (Température Critique Maximale) selon la vitesse d'augmentation de la température (Fig.4)

- diminution de la CTmax avec la vitesse d'augmentation

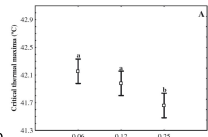


Figure 4 : Effet des vitesses d'augmentation sur *Ceratitis capitata*, Nyamukondiwa et Terblanche, 2010

#### Détermination des CTmax (Fig. 6) :

- troubles de locomotion (CTmax1)
- paralysie (CTmax2)

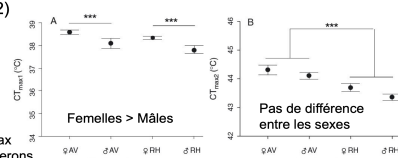


Figure 6 : Mesure de CTmax chez deux espèces de pucerons (AV et RH), Lelann et al., 2011

### 5 Discussion et Conclusion


Maximales thermiques influencées par protocoles, nombreuses variables, interactions entre variables → complexité nécessitant étude approfondie

Pertinence écologique des mesures selon les objectifs de l'étude

Difficulté de comparer les études → protocole standardisé à proposer ?

Etude de *S. littoralis* :

- + test de la sensibilité aux pesticides
- + population naturelle à comparer à la souche de laboratoire



### Références clés

- Boina et Bhadriraju (2004) *Journal of Economic Entomology* 97:6
- Bowler et Terblanche *Biological Reviews* 83:339
- Le Lann et al. (2011) *Physiological Entomology* 36:21
- Lutterschmidt et al. (1997) *Canadian Journal of Zoology* 75:1561
- Nyamukondiwa et Terblanche (2010) *Physiological Entomology* 35:255
- Piyaphongkul et al. (2012) *PLoS ONE* 7:e29409
- Rezende et al. (2014) *Functional Ecology* 28:799
- Rusch et al. (2019) *Journal of Thermal Biology* 85:102405

En savoir plus : « Etude des maximales thermiques chez *Spodoptera Littoralis* – Synthèse Bibliographique »



## Effet des fluctuations thermiques journalières sur la sensibilité des larves de *Spodoptera littoralis* exposées à différents pesticides



BOUANOU Mélissa, BAGNI Thibaut, MASSOT Manuel.

Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (iEES-Paris), Département EcoSens, Équipe CréA, Sorbonne Université.

### Introduction

- **Crise climatique** : Augmentation des températures moyennes à la surface de la Terre + Augmentation des fluctuations thermiques journalières (Wang et al.2014)
- ***Spodoptera littoralis*** : lépidoptère ravageur de culture
- **Chlorpyrifos / Deltaméthrine**: pesticides neurotoxiques avec des cinétiques d'action différentes selon la température (Massot et al. 2021)

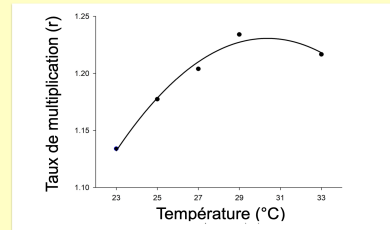
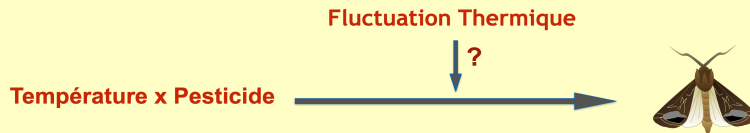


Figure 1. Taux de multiplication de *S.littoralis* en fonction de la température



La fluctuation de température journalière a-t-elle un effet sur la sensibilité aux pesticides chez *Spodoptera littoralis* ?

### Matériel & Méthodes

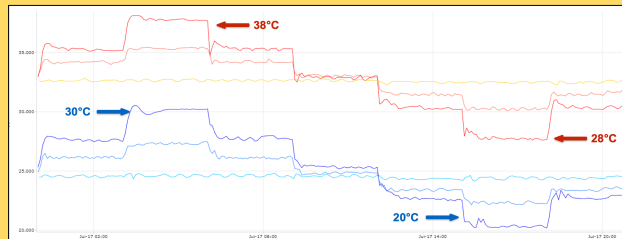
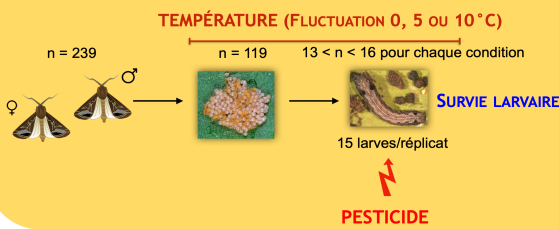


Figure 2. Fluctuation thermique journalière des six profils expérimentaux

### Résultats

Tableau 1. Résultats des analyses logistiques sur la survie larvaire en fonction des différents paramètres (température, fluctuation et pesticide\*) et de leurs interactions

Effet	Chlorpyrifos	Deltaméthrine
Temp	ns	0,010
Fluct	0,049	ns
Pest	<0,0001	<0,0001
Temp x Fluct	ns	ns
Temp x Pest	ns	0,001
Fluct x Pest	ns	0,023
Temp x Fluct x Pest	ns	0,005

\* Chaque pesticide est comparé indépendamment par rapport au contrôle

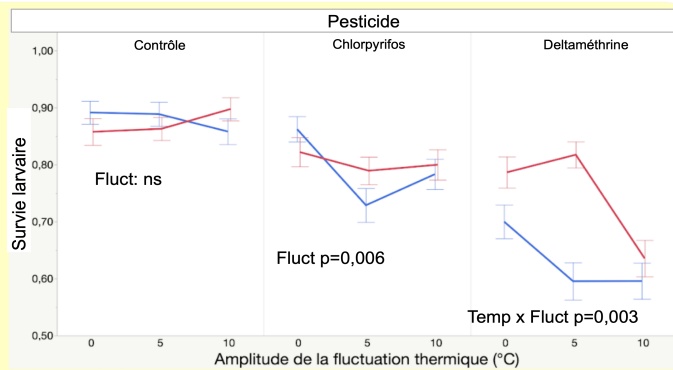


Figure 3. Taux de survie larvaire en fonction de la fluctuation thermique (abscisse bas) et du pesticide (abscisse haut), à 25°C (bleu) et 33°C (rouge)

### Conclusions

L'augmentation des fluctuations thermiques journalières affecte l'effet des pesticides.

Pour le chlorpyrifos, la toxicité est augmentée. Pour la deltaméthrine, la fluctuation a un effet différent selon la température d'étude: à 25°C, la toxicité augmente dès la fluctuation de 5°C alors qu'à 33°C, l'effet a lieu uniquement à la fluctuation de plus grande amplitude.

## Enseignement :

2020/2021 et 2021/2022 : Enseignement en Licence 2 dans l'UE « Introduction à l'écologie » pour l'université Paris Cité.

32 heures annuelles pour 2 TD en salle de 2 heures, et 4 TP sur le terrain et en salle où nous avons échantillonné la faune du sol et identifié la flore dans des milieux afin d'étudier la biodiversité en fonction de la fréquentation humaine et de la présence d'arbres.

## Présentations en colloque :

- **Effet maternel sur la sensibilité au chlorpyrifos chez le ravageur *Spodoptera littoralis***  
Thibaut Bagni, David Siaussat, Annick Maria, Philippe Couzi, Martine Maïbèche et Manuel Massot. Colloque virtuel de la SEFA (Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée). Juillet 2020 - Réalisation d'une vidéo : <https://asso-sefa.fr/colloque-virtuel-2020>
- **Transgenerational effects can influence temperature effect on insecticide toxicity on the pest moth *Spodoptera littoralis***. Thibaut Bagni, David Siaussat, Annick Maria, Phillips Couzi et Manuel Massot. Meeting in Animal Ecophysiology MAEP-5, Montpellier 2-4 Novembre 2021.

## Revue d'article :

Whitaker, M.R.L., Gilliéron, F., Skirgaila, C. *et al.* Experimental evidence challenges the presumed defensive function of a "slow toxin" in cycads. *Sci Rep* 12, 6013 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09298-3>

## Responsabilité au sein de l'école doctorale :

- 2021 et 2022 : Représentant des doctorants au conseil scientifique de l'école doctorale ABIES (Titulaire).
- 2021 et 2022 : Représentant des doctorants au conseil scientifique d'AgroParisTech (Titulaire en 2021 et suppléant en 2022).