



HAL
open science

Influence des facteurs alimentaires et du microbiote intestinal sur la tolérance au stress chez *Drosophila melanogaster*

Youn Henry

► **To cite this version:**

Youn Henry. Influence des facteurs alimentaires et du microbiote intestinal sur la tolérance au stress chez *Drosophila melanogaster*. Biologie animale. Université de Rennes, 2018. Français. NNT : 2018REN1B043 . tel-02067672

HAL Id: tel-02067672

<https://theses.hal.science/tel-02067672v1>

Submitted on 14 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : « Ecologie et Evolution »

Par

Youn HENRY

Influence des facteurs alimentaires et du microbiote intestinal sur la tolérance au stress chez *Drosophila melanogaster*

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 29-11-2018
Unité de recherche : UMR ECOBIO

Rapporteurs avant soutenance :

Geneviève Prévost Professeure, Université d'Amiens
Éric Le Bourg Chargé de recherches, Université de
Toulouse

Composition du Jury :

Zenobia Lewis	Lecturer, University of Liverpool
Patricia Gibert	Directrice de recherche, Université de Lyon
Joan van Baaren	Professeure, Université de Rennes
Philippe Vernon	Directeur de recherche, Université de Rennes
David Renault	Enseignant chercheur, Université de Rennes Directeur de thèse
Hervé Colinet	Chargé de recherches, Université de Rennes Co-directeur de thèse

Table des matières

Table des matières	2
Liste des publications	4
Chapitre 1 - Introduction générale	5
1. Avant-propos.....	6
2. Le stress chez les insectes.....	7
1.1. La variation environnementale à l'origine de la variabilité individuelle.....	7
1.2. Qu'est-ce qu'un stress ?.....	8
1.3. Manifestation des stress au niveau élémentaire.....	10
1.4. La réponse cellulaire au stress.....	12
1.5. La réponse individuelle au stress.....	14
1.6. Implications évolutives du stress.....	20
1.7. Le stress thermique.....	21
3. La nutrition chez les insectes.....	23
3.1. Ecologie nutritionnelle.....	23
3.2. Conséquences des perturbations nutritionnelles.....	28
4. Les relations hôte-microbiote.....	33
4.1. L'holobionte.....	33
4.2. Les rôles du microbiote.....	35
5. Le modèle <i>Drosophila melanogaster</i>	45
5.1. Nutrition chez <i>D. melanogaster</i>	46
5.2. Microbiote intestinal chez <i>D. melanogaster</i>	48
5.3. Stress thermique chez <i>D. melanogaster</i>	50
6. Objectifs et organisation de la thèse.....	53
Chapitre 2 – Effets physiologiques et phénotypiques du microbiote et de l'interaction nutrition-microbiote	57
Article 1 - Microbiota disruption leads to reduced cold tolerance in <i>Drosophila</i> flies.....	58
Article 2 - Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of <i>Drosophila melanogaster</i> in interaction with microbiota.....	63
Chapitre 3 - La surpopulation larvaire : un stress nutritionnel affectant l'hôte et son environnement	86
Article 3 - Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in <i>Drosophila</i> flies.....	87

Article 4 - Competition for resource affects environmental microbial communities without altering gut microbiota in <i>Drosophila melanogaster</i>	95
Chapitre 4 - Discussion et perspectives	115
1. Discussion générale.....	116
1.1. Le phénotype sous l'influence de la nutrition	117
1.2. Le microbiote sous l'influence de la nutrition.....	121
1.3. L'importance du microbiote intestinal pour le phénotype de l'hôte : un effet nutritionnel ?	123
2. Perspectives et futures directions de recherche	128
2.1. Le futur des interactions nutrition-microbiote : quelles directions pour mieux comprendre les phénotypes ?	128
2.2. Se détacher de l'individu pour explorer des échelles différentes	131
2.3. Conclusions	135
Références	136
Remerciements	169

Liste des publications

Le corps de cette thèse est basé sur des articles qui sont publiés (articles 1 et 3), ou bientôt soumis (articles 2 et 4). Dans le texte, j'y fais référence en utilisant leurs numéros respectifs.

- Article 1 **Henry, Y. and Colinet, H.** (2018). Microbiota disruption leads to reduced cold tolerance in *Drosophila* flies. *The Science of Nature* **105**, 59.
- Article 2 **Henry, Y., Overgaard, J. and Colinet, H.** Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of *Drosophila melanogaster* in interaction with microbiota. *In prep*
- Article 3 **Henry, Y., Renault, D. and Colinet, H.** (2018). Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in *Drosophila* flies. *Journal of Experimental Biology* **221**, jeb178681.
- Article 4 **Henry, Y., Renault, D. and Colinet, H.** Competition for resource affects environmental microbial communities without altering gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. *In prep*.

Les références des articles publiés sont incorporées au texte, tandis que les références des articles 2 et 4, ainsi que celles de l'introduction générale et de la discussion générale sont toutes regroupées à la fin.

Chapitre 1 - Introduction générale

“Then am I
A happy fly,
If I live,
Or if I die.”

William Blake (1794) The Fly



1. Avant-propos

L'intitulé de cette thèse (« Influence des facteurs alimentaires et du microbiote intestinal sur la tolérance au stress chez *Drosophila melanogaster* ») fait écho à trois champs disciplinaires que sont la biologie du stress, la biologie de la nutrition, et les interactions insectes-microorganismes. Ces trois aspects, en apparence pourtant très distincts, s'influencent mutuellement et génèrent des interactions qui demeurent à ce jour encore peu explorées et donc peu comprises. Cette thèse propose de regrouper en son sein toutes ces thématiques, dans le but de répondre aux questions « comment le statut nutritionnel affecte la tolérance au stress ? », « comment le microbiote intestinal affecte la tolérance au stress ? », « comment le microbiote intestinal affecte le statut nutritionnel de l'hôte, et réciproquement, comment la nutrition modifie le microbiote ? », et enfin « comment interagissent microbiote intestinal et nutrition, et quelle en est la résultante sur le phénotype de tolérance au stress des organismes ? ».

Afin de contextualiser ce travail et d'amener le lecteur à comprendre l'intérêt de ces questionnements, j'aborde tour à tour dans l'introduction générale la littérature traitant de ces sujets, dans des parties séparées. Je commence donc par présenter ce qu'est un stress pour les insectes, et ce que cela entraîne comme conséquences physiologiques aux différents niveaux d'organisation biologiques, depuis l'intérieur des cellules jusqu'aux individus. Le stress thermique est particulièrement contraignant pour les insectes et occupe une place importante à l'intérieur des chapitres suivants ; c'est pourquoi j'y porte une attention particulière dans cette section. Dans la section suivante, je présente les différents concepts développés par la littérature autour de l'écologie nutritionnelle chez les insectes, et j'aborde également les conséquences physiologiques que peuvent entraîner des perturbations quantitatives et/ou qualitatives de la nutrition. Enfin, je développe la partie centrée sur le microbiote des insectes en commençant par passer en revue la littérature abordant les concepts de méta-organisme et d'holobionte. Je liste ensuite les principaux rôles qu'occupe le microbiote chez les insectes, en illustrant mes propos à travers divers exemples, et en attachant plus d'importance aux rôles pouvant être reliés à la nutrition ou à la tolérance au stress.

Après la présentation des caractéristiques du modèle biologique (*D. melanogaster*) et de la structure détaillée du manuscrit, s'enchaînent deux chapitres regroupant le travail expérimental effectué au cours de cette thèse. Le premier chapitre porte sur les effets du microbiote intestinal sur le phénotype de l'hôte, et notamment sur sa tolérance au stress thermique. Ensuite, les effets du microbiote intestinal sur les Drosophiles sont observés dans diverses conditions nutritionnelles, de façon à pouvoir mesurer l'importance de l'interaction entre nutrition et microbiote. Le second chapitre s'attache de nouveau à explorer l'interaction entre nutrition et

microbiote, mais cette fois dans le cadre d'une situation de compétition interindividuelle intraspécifique. Du fait de son mode et vie et de reproduction, la compétition pour la ressource nutritionnelle est commune chez *D. melanogaster*. Des conditions de surpopulation larvaire peuvent rapidement émerger et générer de forts stress nutritionnels ainsi qu'un changement drastique du milieu de vie, affectant non seulement les mouches mais aussi la communauté de microorganismes y étant associés. Ces caractéristiques en font un excellent point de départ pour aborder la complexité des interactions nutrition-microbiote chez ces insectes, dans un contexte écologiquement pertinent. Un dernier chapitre de discussion générale permet de regrouper l'ensemble de ces résultats en y portant un regard plus global, en extrayant les conclusions les plus importantes, et en proposant des pistes pour de futures études afin de compléter ce travail.

2. Le stress chez les insectes

1.1. La variation environnementale à l'origine de la variabilité individuelle

L'environnement peut être vu comme la somme d'un grand nombre de paramètres dynamiques, qui incluent à la fois les aspects liés aux états physique et chimique de la matière (*i.e.* les paramètres abiotiques) et les aspects liés aux interactions entre organismes vivants (*i.e.* les paramètres biotiques) (Begon et al., 2005).

Par leur omniprésence, les paramètres abiotiques influencent tous les organismes. Ils regroupent l'ensemble des variables climatiques (température, humidité, rayonnement UV), des paramètres physico-chimiques externes (pH, acidité, salinité, métaux), ainsi que les caractéristiques des ressources trophiques (nutriments, toxicité). Si cette liste n'est pas exhaustive, elle représente néanmoins fidèlement l'orientation des recherches menées sur le sujet : les paramètres exerçant les contraintes les plus fortes sur les organismes sont aussi les mieux décrits (Chown et Nicolson, 2004). La température par exemple fait l'objet de nombreuses études chez les organismes ectothermes, c'est-à-dire incapables de produire leur propre chaleur corporelle, tels que les insectes (Sinclair et al., 2003). En effet, chez ces espèces, l'intérêt de comprendre les effets de la température est grand car c'est ce paramètre qui va en majeure partie définir leur survie, leur reproduction, ou encore leur phénologie (Deutsch et al., 2008; Sinclair et al., 2003; Somero, 2012).

Les paramètres biotiques quant à eux sont beaucoup plus dépendants de la situation étudiée, des espèces en question, et de leur relation au sein du réseau trophique. Ils sont également plus complexes car les différentes entités biologiques en interaction peuvent elles-mêmes dépendre

des facteurs abiotiques. Il est cependant possible de les rassembler en catégories distinctes se différenciant par la nature de l'effet de l'entité A sur B et de B sur A (+/+ : coopération, -/- : compétition, +/- : prédation, pour les principaux) (Begon et al., 2005).

Tous les organismes ne peuvent pas vivre dans tous les environnements. En fait, chaque espèce ne peut vivre que dans une gamme restreinte de conditions environnementales biotiques et abiotiques (Tews et al., 2004). Et même à l'intérieur de cette gamme, certaines conditions sont préférables à d'autres, nécessitant une certaine capacité de variabilité individuelle, que l'on appelle la plasticité phénotypique (Agrawal, 2001; West-Eberhard, 2003). La pression qu'exerce l'environnement sur les organismes est à donc l'origine de la diversité spécifique, fonctionnelle, et physiologique des organismes (Begon et al., 2005; Chown et Nicolson, 2004; Chown et al., 2010; Tews et al., 2004; West-Eberhard, 2005).

1.2. Qu'est-ce qu'un stress ?

Lorsqu'une variation environnementale atteint des valeurs sub- ou supra-optimales et que cela s'avère néfaste pour la valeur sélective d'un individu, on la qualifie de stressante (fig. 1A) (Korsloot et al., 2004). Le stress est donc relatif à l'individu, ou plus précisément à la niche écologique considérée. La niche écologique définit un espace multidimensionnel fictif, permettant la vie d'un organisme (Begon et al., 2005). Chaque dimension de la niche représente alors un paramètre environnemental qui la délimite. On parle de niche fondamentale lorsque seuls les paramètres abiotiques sont considérés, et de niche réalisée lorsque les paramètres biotiques sont aussi pris en compte, réduisant alors plus ou moins la niche fondamentale (fig. 1B) (Begon et al., 2005; Hutchinson, 1957). Si la définition du stress basée sur son « effet néfaste » est généralement suffisante, elle reste largement débattable, imprécise et ne prend pas en compte l'ensemble des sens du mot. D'une part, il est compliqué d'explicitier la limite à partir de laquelle des conditions peuvent être jugées néfastes au point d'être stressantes (Parker et al., 1999) : les effets d'un paramètre se produisent le long d'un continuum allant de l'absence d'effet à la létalité, et ne présentent que rarement une réponse binaire ou discrète (Begon et al., 2005). D'autre part, il est important de noter que le terme a perdu de sa précision lors de sa traduction, et est utilisé indifféremment en français pour désigner le *stressor* (le facteur externe) et le *stress* (l'état physiologique interne). On parle donc de stress pour désigner les causes, mais également pour parler des conséquences, c'est-à-dire l'état de désordre physiologique généré au niveau individuel (au niveau populationnel et au-delà, son usage est minoritaire). Korsloot et al. (2004) définit alors le stress comme suit :

« Le stress est une condition d'un organisme provoquée par un ou plusieurs facteurs environnementaux qui emmènent l'organisme aux limites ou au-delà des limites de sa niche écologique »

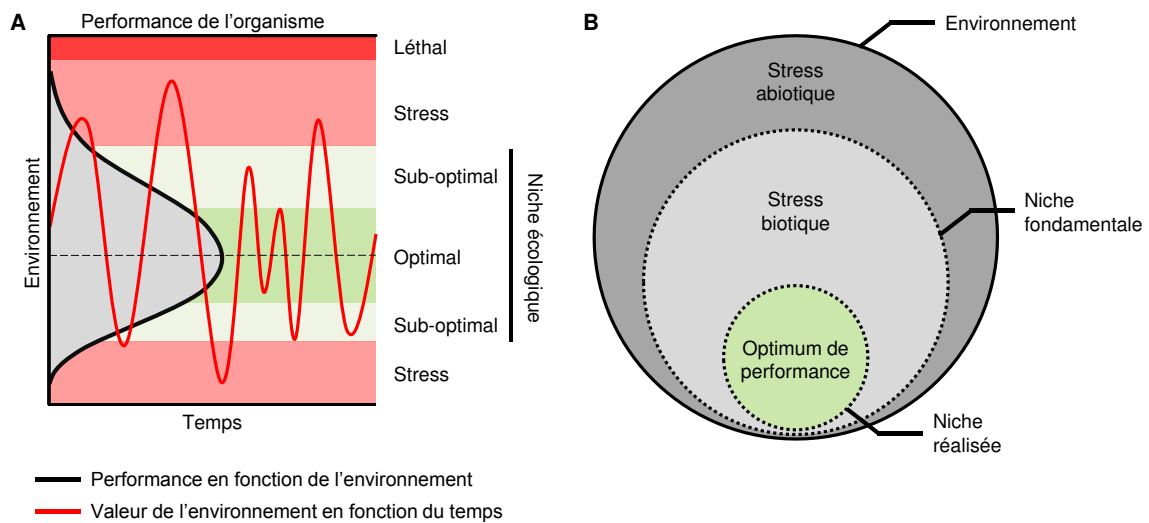


Figure 1 : (A) Courbe de performance de l'organisme en fonction des valeurs d'un paramètre environnemental. Les variations de l'environnement peuvent conduire à l'apparition de stress, et donc à une sortie de la niche écologique. Cela a pour conséquence de réduire la performance de l'organisme. (B) Représentation du concept de niche écologique. Les stress abiotiques empêchent la niche fondamentale de s'étendre sur l'ensemble de l'environnement, et les stress biotiques empêchent la niche réalisée de correspondre à la niche fondamentale.

Dans la nature, sortir de sa niche écologique se traduit par une diminution voire un arrêt de la croissance ainsi que de la reproduction, et donc une diminution de la valeur sélective. Être en dehors de sa niche écologique n'est pas toujours léthal si par exemple le stress est transitoire, ou qu'une réponse au stress appropriée se met en place. A l'inverse, des pressions environnementales faibles ou chroniques peuvent être qualifiées de stress sans pour autant entraîner d'effet négatif, voire en améliorant certains traits d'histoire de vie (Costantini, 2014; Le Bourg et Rattan, 2008; Le Bourg, 2015). Quelle que soit la manifestation externe du stress, elle prend nécessairement sa source dans un dérèglement aux niveaux d'organisation inférieurs de l'individu, et en particulier au niveau cellulaire. A ce niveau, le stress qualifie une perturbation de l'homéostasie. Cela signifie que l'équilibre dynamique permettant le fonctionnement optimal de la cellule (intégrant de nombreux paramètres comme le pH, la température, l'osmolalité...) est rompu (Korsloot et al., 2004). Ce phénomène est suivi par la mort cellulaire (par apoptose ou non) ou par un retour à l'homéostasie (Korsloot et al., 2004). L'amplitude des valeurs d'un paramètre avant qu'il ne devienne stressant définit la valence écologique d'une espèce. On parle d'espèces ou populations euryèces quand elles tolèrent une large gamme de valeurs avant qu'un stress physiologique ne soit généré, et à l'inverse de sténoèces quand cette gamme est réduite.

1.3. Manifestation des stress au niveau élémentaire

Le type et l'intensité du stress déterminent les effets physiologiques et les voies par lesquelles l'organisme est affecté. Comprendre leur mode d'action permet alors de mieux envisager leurs conséquences et leurs interactions. En fonction des auteurs, le découpage des catégories de stress peut beaucoup varier. Selon Korsloot et al. (2004), le stress se répartit en quatre catégories que sont le stress protéotoxique, le stress oxydant, le stress des métaux, et le stress génotoxique. Ces catégories sont largement chevauchantes, et par exemple on peut noter que le stress oxydant peut tout à fait être protéotoxique, que le stress des métaux est un cas particulier du stress protéotoxique, ou encore que le stress génotoxique est un cas particulier du stress oxydant. De plus, ces classes omettent un certain nombre de stress qui ne rentrent dans aucune de ces catégories comme le stress osmotique ou le stress nutritionnel. Plutôt que de décrire exhaustivement des catégories parfois floues, je vais évoquer les principaux mécanismes du stress, notamment au niveau moléculaire, en me focalisant sur ceux qui nous intéresseront au cours de ce travail.

Stress oxydant

Le métabolisme de toute cellule génère des molécules que l'on regroupe sous le terme d'« espèces réactives de l'oxygène » (ERO). L'origine de ces composés au pouvoir pro-oxydant se trouve principalement dans les mitochondries, dont l'activité de respiration nécessite une réaction de phosphorylation oxydative générant des ions superoxyde, du peroxyde d'hydrogène ou encore des radicaux hydroxyles (Apel et Hirt, 2004; Barja, 2007; Dowling et Simmons, 2009). Lorsque ces ERO sont produites en grandes quantités, elles peuvent altérer le fonctionnement de la cellule en générant des dommages moléculaires, avec pour cibles principales les macromolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN (Korsloot et al., 2004). Afin de limiter ces effets délétères pour l'organisme, la cellule est capable de produire des composés antioxydants qui viennent contrebalancer cela. Ce sont par exemple les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases, ou encore les catalases (Costantini, 2014). A cela s'ajoute un cortège de molécules synthétisées par l'organisme (glutathion) ou issues de l'alimentation (vitamine E, caroténoïdes) possédant un potentiel antioxydant passif (Costantini, 2014). Lorsque la balance est maintenue, le potentiel d'oxydo-réduction (redox) est dans un état d'équilibre dynamique, et les ERO sont alors des composés utiles pour la cellule permettant la transmission de signaux biologiques, la réponse immunitaire, ou la défense contre les pathogènes et les prédateurs (Dowling et Simmons, 2009; Ha et al., 2009; Holmström et Finkel, 2014). Le stress oxydant se manifeste lorsqu'un paramètre vient perturber cet équilibre, soit en augmentant la production de pro-oxydants, soit en diminuant la production d'antioxydants (Apel et Hirt, 2004; Costantini, 2014). La quantité d'ERO est donc toujours supérieure à zéro, et c'est la capacité de l'organisme à les recycler qui va ou non générer

le stress. L'état de stress est alors un continuum dans le déséquilibre redox d'une cellule, défini comme « le taux auquel les dégâts oxydatifs sont générés » (Costantini, 2014). La perte progressive de la capacité des organismes à conserver l'équilibre redox et à réparer les dommages au cours du vieillissement est d'ailleurs à la base de la *oxidative theory of aging* (Harman, 1972; Muller et al., 2007), bien que le consensus actuel tende à diminuer l'importance accordée à ce processus dans le vieillissement (Gems et Doonan, 2009; Le Bourg, 2001; Pérez et al., 2009; Salmon et al., 2010).

Le stress oxydant représente vraisemblablement une pression de sélection considérable car il prend sa source dans un processus commun à l'ensemble du vivant : la respiration (Costantini, 2014). Pour autant, c'est un stress généralement secondaire dans sa mise en place, car il nécessite une perturbation de l'homéostasie préalable, c'est-à-dire une incapacité ponctuelle à réguler un déséquilibre au sein de la cellule. L'élément déclencheur peut être un stress physique ou chimique augmentant la vitesse du métabolisme et donc la production d'ERO, dénaturant des protéines clés dans la synthèse enzymatique, ou encore déstabilisant les membranes et l'équilibre osmotique par exemple. Le stress oxydant va donc amplifier les effets d'un autre stress.

Les autres stress

L'altération de la fonction des macromolécules ne passe pas exclusivement par l'oxydation. La structure tridimensionnelle fine des protéines est fondamentale pour leur fonctionnement. On peut penser notamment aux sites de liaison d'enzymes qui sont des zones dont la conformation permet de s'associer à une molécule cible, et de servir de précurseur à l'action enzymatique. Ces structures, comme de nombreuses autres, sont en partie dues aux liaisons hydrogènes, plus faibles que des liaisons covalentes, et donc plus susceptibles d'être altérées. Certains stress physiques tels que des changements de température ou des déséquilibres osmotiques, ainsi que divers agents chimiques (urée, bases et acides forts, métaux lourds) peuvent modifier ces liaisons hydrogène (Bennion et Daggett, 2003; Korsloot et al., 2004; Privalov, 1990; Tsai et al., 2002). S'en suivent alors divers problèmes au niveau de la cellule, où les protéines dysfonctionnelles et agrégées conduisent généralement à du stress oxydant et à la mort cellulaire si la protéostasie ne peut pas être rétablie (Steinberg, 2012).

Le stress hydrique représente un stress à part. Historiquement très étudié chez les plantes (Anjum et al., 2011; Zhu, 2002), ce stress est tout aussi important pour d'autres taxons tels que les insectes par exemple (Kostál et al., 2004). Plusieurs facteurs environnementaux peuvent provoquer un stress hydrique : la dessiccation évidemment, mais également l'exposition au froid, ou encore à la salinité (Somero et Yancey, 2010; Yancey, 2005). Lorsque l'hémolymphe des insectes change d'osmolarité, que ce soit à cause d'une indisponibilité de l'eau augmentant la concentration des ions, de l'arrêt des pompes Na^+/K^+ , ou d'une augmentation de la salinité de l'environnement,

deux évènements se produisent : 1) le potentiel de membrane est affecté et limite la capacité de la cellule à échanger avec l'extérieur, et 2) l'eau des cellules tend à s'échapper pour maintenir un équilibre de charge (Kostál et al., 2004; Overgaard et MacMillan, 2017). Stress hydrique et stress osmotique sont donc largement interconnectés, et si l'homéostasie osmotique n'est pas rapidement rétablie, alors ces deux problèmes peuvent devenir létaux (Kostál et al., 2004).

1.4. La réponse cellulaire au stress

Nous avons vu que face aux contraintes environnementales, des dommages sont infligés aux macromolécules, ceux-ci ayant des conséquences sur le fonctionnement cellulaire. Au cours de leur évolution, les organismes ont développé des réponses permettant de prévenir ou réparer ces dommages, en particulier sur les macromolécules telles que les protéines ou l'ADN par exemple (Bukau et Horwich, 1998; Gasch et al., 2000; Kültz, 2005). Nous avons également vu que, si les types de stress et leurs conséquences physiologiques sont très nombreux, les mécanismes primaires générant des dommages se recoupent énormément, et sont finalement peu diversifiés. Il n'est donc pas surprenant qu'une réponse cellulaire au stress (RCS) ubiquiste soit activée de façon universelle dans la quasi-totalité des cellules (Kültz, 2005). Les fonctions de la RCS incluent l'ajustement des cycles cellulaires et du métabolisme, la réparation et le chaperonnage de protéines, la réparation et stabilisation de l'ADN, et enfin le recyclage des protéines endommagées (Kültz, 2005). Il est important de rappeler les grands principes de ces fonctions.

En cas de stress, il existe des systèmes de sécurité permettant de limiter les dommages qui pourraient affecter l'état de la cellule lorsqu'elle est en mitose (Murray, 1994). En effet, durant le cycle cellulaire, la chromatine va changer d'état, et rendre l'ADN beaucoup plus sensible à d'éventuelles détériorations par des facteurs potentiellement génotoxiques induisant des mutations ou des erreurs de réplication (Hartwell et Weinert, 1989; Kültz, 2005). Cela est également vrai dans une moindre mesure durant la transcription des gènes. Des étapes (ou *checkpoints*) permettent de détecter des dommages et, si besoin, arrêter le cycle cellulaire et la croissance (Pearce et Humphrey, 2001). De cette façon, le risque d'apparition de nouveaux dommages ainsi que la réplication de ces dommages dans les nouvelles cellules est limité, et cela permet également la mise en place de processus de réparation.

La réparation et le maintien de l'intégrité des macromolécules au sein de la cellule sont assurés par un groupe de protéines que l'on retrouve exprimées en réponse au stress dans de très nombreux taxons. C'est le protéome de stress minimal (Kültz, 2005; Steinberg, 2012). Parmi les protéines du protéome de stress minimal, on retrouve un grand nombre de chaperons moléculaires (Hartl, 1996). Leur rôle consiste à 1) se lier à d'autres protéines afin d'éviter qu'elles ne modifient leur

conformation, et n'interagissent ou ne s'agrègent de façon inappropriée avec diverses molécules, 2) reconnaître les protéines dénaturées (dépliées) ou dysfonctionnelles afin de leur redonner leur conformation initiale, 3) relocaliser les protéines dans les divers compartiments cellulaires, 4) reconnaître les protéines devant être détruites (Feder et Hofmann, 1999; Kültz, 2003). Toutes ces fonctions sont constitutives, c'est-à-dire que certaines protéines chaperonnes sont synthétisées et actives quel que soit l'environnement, tout cela afin de « faire le ménage » dans les cellules, d'où leur dénomination anglaise de *housekeeping functions* (Feder et Hofmann, 1999). Le stress va donc principalement amplifier l'expression de protéines constitutives qui étaient déjà présentes, et étoffer le cortège de protéines en y ajoutant des protéines inductibles spécifiques. La diversité des protéines chaperonnes est grande, cependant quelques-unes d'entre-elles sont communes à l'ensemble des eucaryotes et bactéries (Kültz, 2005). Ce sont les protéines GrpE, les peptidyl-prolyl isomérases ainsi que les *heat shock proteins* (HSP), sHSPs, HSP40, HSP60, HSP70, et HSP90. Elles comptent d'ailleurs parmi les molécules les plus abondantes au sein des cellules, représentant des quantités comparables aux protéines du métabolisme énergétique ou du cytosquelette par exemple (Petra et al., 2008; Wang et al., 2009). La remarquable conservation phylogénétique des chaperons moléculaires témoigne de l'importance fondamentale de leurs fonctions. En effet, malgré leur dénomination de *heat shock* qui constitue un héritage de leur découverte (Tissières et al., 1974), leur spectre d'action se révèle bien plus large. Elles sont par exemple impliquées dans la réponse à de très nombreux stress autres que le chaud (froid, oxydant, métaux, toxiques...etc) ainsi que dans le maintien de la protéostasie en absence de stress (Feder et Hofmann, 1999; Steinberg, 2012).

Les chaperonnes ne sont pas les seules représentantes du protéome de stress minimal. D'autres protéines, aux rôles plus spécifiques, permettent l'élimination des ERO (superoxyde dismutase, déhydrogénases, peroxydases...), la réparation de l'ADN (MutS, MutL, RAD51...), la dégradation des protéines dysfonctionnelles (complexe protéasome), ainsi que l'ajustement du métabolisme (citrate synthase, enolase...) (Kültz, 2005). Toutes ces fonctions participent au maintien d'un certain équilibre dynamique à l'intérieur de la cellule, qui passe par une activité de transcription permanente, la conservation du potentiel membranaire, la régulation du pH...etc. On appelle cet équilibre l'homéostasie cellulaire, et lorsque, malgré la réponse au stress, l'homéostasie ne peut être maintenue, la cellule meurt. La mort cellulaire peut être passive (nécrose) ou active (apoptose le plus souvent) et marque l'ultime étape dans le processus RCS, évitant alors la propagation des dommages dans les cellules saines (Davies, 2000; Korsloot et al., 2004).

La RCS est ubiquiste car elle est principalement déclenchée par les dommages moléculaires et le stress oxydatif, communs à une grande partie des stress environnementaux. C'est un mécanisme vraisemblablement apparu tôt dans l'évolution, permettant aux organismes de tolérer une large

gamme d'environnements (Kültz, 2003). Pour autant, la RCS varie aussi de façon spécifique avec certains stress. C'est le cas par exemple du stress osmotique, qui peut présenter une réponse unique tant au niveau de la détection du stress, que des mécanismes mis en jeu pour y répondre (gènes régulant la concentration en osmolytes compatibles) (Miyakawa et al., 1999; Reiser et al., 2003).

1.5. La réponse individuelle au stress

Les perturbations engendrées par le stress aux niveaux les plus élémentaires (moléculaires et cellulaires), vont avoir des conséquences secondaires sur une multitude de fonctions biologiques et donc potentiellement impacter la physiologie globale des individus (Chown et Nicolson, 2004). En réponse à cela, les organismes disposent de mécanismes visant à ajuster leur phénotype, et ainsi survivre au stress. On distingue généralement trois grandes stratégies, représentées dans la figure 2 (Van Straalen, 2003). La première consiste à faire face au stress et en minimiser les dommages via la réponse appropriée qui témoigne d'une certaine plasticité physiologique. La seconde se met en place grâce à une adaptation ou une plasticité phénotypique qui permet de déplacer la niche écologique pour qu'elle corresponde aux nouvelles conditions de l'environnement. La troisième est une réponse généralement comportementale, au cours de laquelle les organismes cherchent à fuir la contrainte pour revenir à des conditions environnementales plus acceptables. La réponse individuelle au stress est donc la combinaison de ces différentes stratégies.

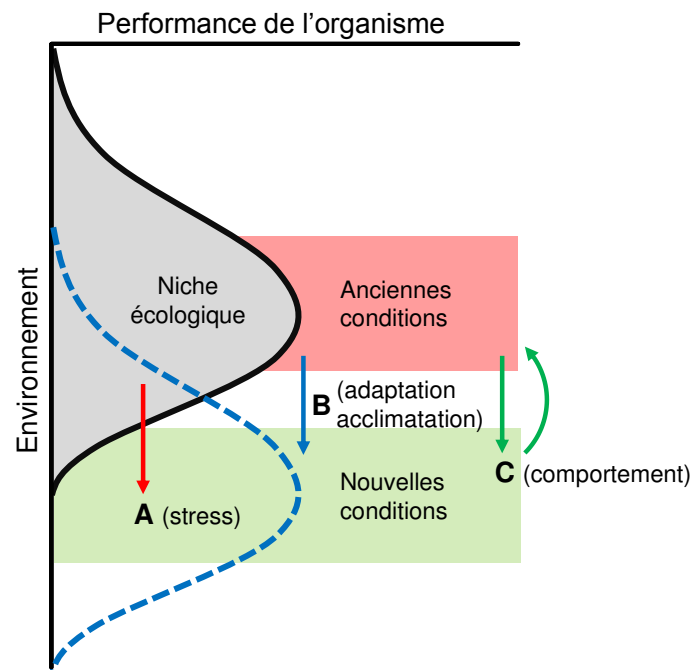


Figure 2 : Courbe de performance de l'organisme en fonction des valeurs d'un paramètre environnemental. Un changement de conditions environnementales entraîne trois réponses possibles : (A) l'organisme fait face au stress et limite les dommages via la réponse au stress en attendant un retour aux conditions normales, (B) l'organisme ajuste sa niche par adaptation ou acclimatation, et ce qui constituait un stress auparavant est désormais un environnement acceptable, (C) l'organisme n'accepte pas les nouvelles conditions et cherche à retrouver les anciennes. Adapté d'après Van Straalen (2003).

Différentes formes de réponses plastiques

La plasticité phénotypique est définie comme « l'expression de plusieurs phénotypes à partir d'un même génotype, sous l'influence d'un environnement changeant » (Chown et Nicolson, 2004; Herron et Freeman, 2013; Pigliucci, 2005). C'est une réponse relativement rapide, car elle se met en place à l'échelle d'un individu, sans nécessiter de multiples générations de sélection. C'est pour cela que la notion de plasticité est souvent opposée à la notion d'évolution, cette dernière impliquant des changements génétiques sur le temps long (Gienapp et al., 2008). Néanmoins, plasticité et évolution sont parfois plus chevauchantes qu'il n'y paraît, avec la transmission transgénérationnelle de l'acclimatation (Ryu et al., 2018), ou à l'inverse l'apparition de phénomènes évolutifs sur des temps relativement courts (Kubrak et al., 2017; Partridge et al., 1995).

L'ajustement de la physiologie ou de la morphologie générale d'un organisme face à un stress est permis par la plasticité phénotypique (Agrawal, 2001). Comme présenté dans la figure 3, lorsque cet ajustement est réversible on parle d'acclimatation (Angilletta Jr., 2009; Whitman, 2009), et lorsqu'il est durable (voire définitif) on parle de plasticité développementale (Chown et Nicolson,

2004; Piersma et Drent, 2003). La distinction est généralement faite également selon que l'environnement génère un continuum de phénotypes (norme de réaction), ou ne génère qu'un nombre restreint de phénotypes discrets (polyphénisme) (Nijhout, 2003; Simpson et al., 2011).

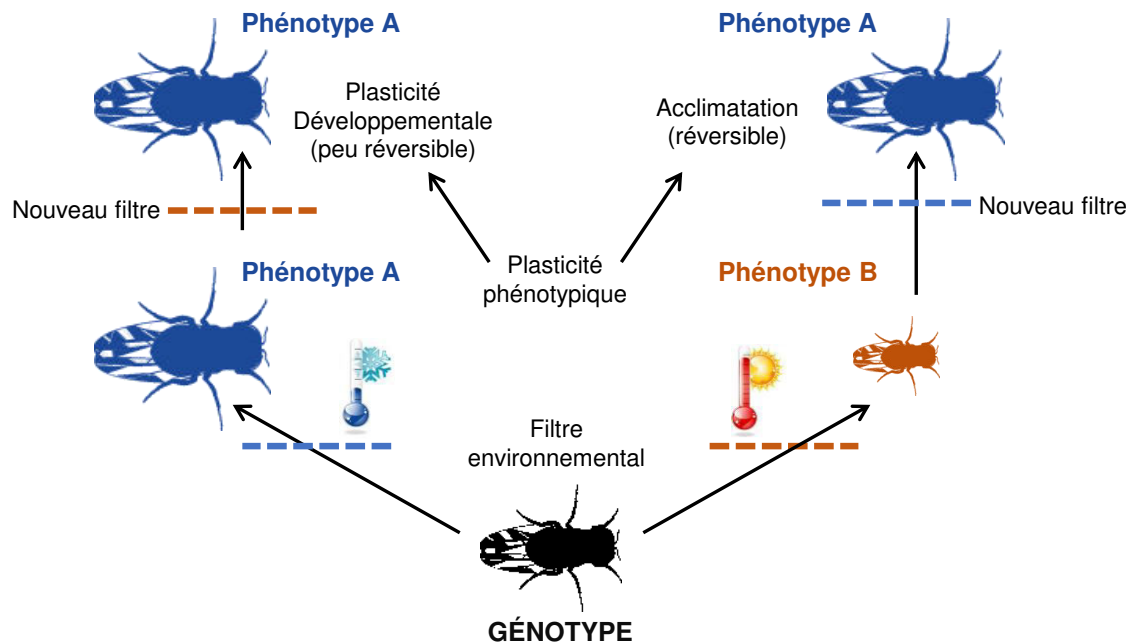


Figure 3 : Représentation schématique du concept de plasticité phénotypique. L'environnement peut ici conduire le génotype vers deux phénotypes différents, mieux adaptés aux contraintes qu'ils subissent. Lorsque la plasticité est développementale, elle est peu réversible. Lorsque la plasticité résulte d'une acclimatation, le phénotype reste flexible.

De nombreux exemples d'acclimatation et de plasticité développementale ont été mis en évidence dans la littérature, que ce soit en réponse à la température, la sécheresse, la surpopulation, la faible ressource alimentaire ou encore la prédation (Holmstrup et al., 2002; Imasheva et Bublly, 2003; Nijhout, 2003; Sinclair et Roberts, 2005). Parmi ces exemples, l'acclimatation aux températures froides a largement été analysée, et permet d'améliorer substantiellement la survie des individus conditionnés (ou pré-exposés) (Andersen et al., 2016; Colinet et Hoffmann, 2012). La capacité des organismes à pouvoir générer des phénotypes acclimatés à l'environnement est donc particulièrement importante. Elle est non seulement à la base de la variabilité interindividuelle nécessaire à l'évolution (cf 1.1), mais elle conditionne aussi les stratégies adaptatives développées par les espèces. Modifier son phénotype constitue en effet un mécanisme permettant de déplacer sa niche écologique afin qu'elle coïncide avec la variabilité environnementale (fig. 2). Un trait peu plastique sera alors adapté à un environnement spécifique, tandis qu'un trait très plastique sera adapté dans une grande gamme d'environnements (Auld et al., 2010). Ici, la plasticité apparaît comme un atout, pourtant, elle est loin d'être omniprésente dans le monde vivant. Certaines espèces comme celles vivant dans les régions polaires possèdent même des gammes de

tolérance très restreintes face à un stress tel que la température (Pörtner et al., 2000). L'inégalité entre espèces vis-à-vis de la gamme de plasticité qu'elles peuvent soutenir n'est en fait pas un désavantage brut, car la plasticité possède un coût (Auld et al., 2010; Pigliucci, 2005). Dans diverses études, il a été montré que la valeur adaptative associée à un trait pouvait être supérieure chez un individu aux faibles capacités plastiques comparativement à un individu ayant la même valeur de trait, mais présentant une forte plasticité (Agrawal et al., 2002; Ferguson et al., 2016; Kristensen et al., 2008; Merilä et al., 2004; Relyea, 2002). Il convient donc de considérer la plasticité comme une adaptation dont le coût ne sera inférieur aux bénéfices que lorsque l'environnement est suffisamment variable.

L'hormèse

L'hormèse est un type de réponse plastique suffisamment singulier pour justifier une partie dédiée. Les concepts derrière le terme d'hormèse sont largement abordés par Calabrese et Baldwin (2002) qui aboutissent à cette définition :

« L'hormèse est une réponse adaptative caractérisée par une dose-réponse en deux phases, pouvant être directement induite ou être le résultat d'une surcompensation, mais résultant dans les deux cas en une stimulation d'amplitude similaire et généralement modérée »

L'intérêt d'une telle définition est qu'elle élimine les critères subjectifs de « bénéfiques » qui la rendaient peu claire auparavant, entretenant la confusion entre de nombreux termes (perturbation intermédiaire, bénéfice du faible stress, réponse compensatoire, endurcissement...etc). Cependant, dans ce nouveau cadre, le très large chapeau de ce que le terme représente est encore sujet à débats sémantiques (Chapman, 2002). De plus, cette définition nécessite d'explicitier ce que sont une induction directe et une surcompensation. Calabrese et Baldwin (2002) parlent de réponse directe lorsqu'une faible dose de stress induit directement une stimulation différente d'une forte dose. L'alternative est que la faible dose produise un effet similaire (mais quantitativement moins important) à celui d'une forte dose, mais que l'organisme y réponde de façon excessive, inversant l'effet par surcompensation. La figure 4 représente le phénomène d'hormèse, où l'on peut observer une réponse en deux phases dépendantes de la dose de stress. Dans cet exemple, l'effet du stress est positif aux faibles doses car la valeur du trait phénotypique est supérieure à sa valeur en l'absence de stress. Lorsque le stress devient trop fort, son effet redevient négatif.

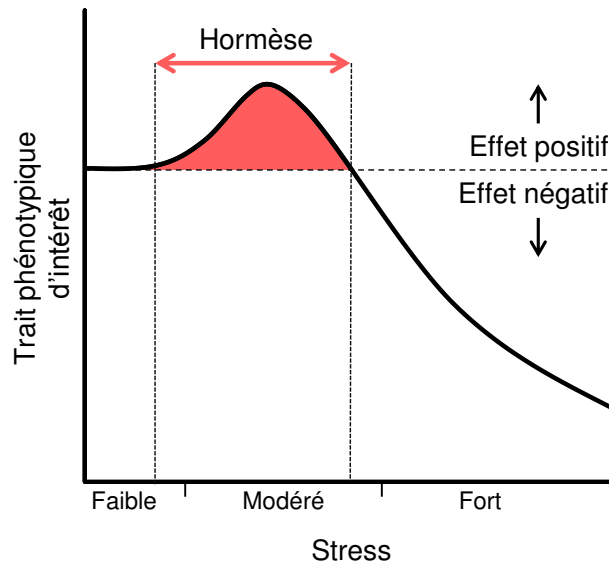


Figure 4 : Schéma d'une courbe dose-réponse montrant un effet hormétique. Ici, le trait phénotypique est amélioré par le stress (zone rouge), jusqu'à ce que ce dernier devienne trop intense. Adapté d'après Calabrese et Baldwin, (2002)

Les premières observations de phénomènes d'hormèse ont pour origine les travaux sur les effets de composés toxiques ainsi les radiations (Calabrese et Baldwin, 2000; Luckey, 2006; Stebbing, 1982). Il est néanmoins parfaitement possible d'extrapoler le concept à des stress dont la « dose » est plus difficile à estimer (stress thermique, stress nutritionnel), bien que ce vocabulaire soit parfois délaissé (Steinberg, 2012). Par exemple, il a été montré que l'exposition à un stress froid modéré, à une nourriture pauvre, à une privation en eau, ou même à une gravité accentuée pouvait générer des effets d'hormèse, en améliorant la longévité ou la survie à de nouveaux stress (Bubliy et al., 2012b; Catterson et al., 2018; Costantini, 2014; Henry et al., 2018; Le Bourg, 2007; Le Bourg, 2015). Il est particulièrement intéressant de constater que l'hormèse peut améliorer la survie à des stress très différents de celui ou ceux qui ont déclenché la réponse (Steinberg, 2012). En fait, l'hormèse peut constituer parfois un mécanisme de tolérance croisée, qui se définit par l'amélioration de la tolérance à un stress par la mise en place d'une réponse à un autre stress (Sinclair et al., 2013; Steinberg, 2012; Sulmon et al., 2015). Cette propriété est due à la nature de la réponse cellulaire au stress (cf 1.4), qui peut être ubiquiste pour des stress pourtant dissemblables en apparence. Une altération de la conformation des macromolécules au sein de la cellule sera contrée par l'expression de protéines chaperonnes, que cette altération soit due à un stress chaud ou à une dessiccation par exemple. De la même manière, un déséquilibre redox induira la production d'antioxydants réduisant les dommages oxydatifs quelle que soit l'origine du stress. L'hormèse peut alors présenter un avantage adaptatif, notamment lorsque plusieurs contraintes environnementales sont corrélées et s'appliquent de façon conjointe (Costantini, 2014).

Les autres réponses individuelles au stress

D'autres mécanismes de réponse au stress existent, et sont souvent des caractéristiques liées aux modes de vie des différentes espèces. Dans un groupe taxonomique aussi diversifié et rencontrant un panel de contraintes environnementales aussi large que celui des insectes, la gamme de stratégies de réponse au stress est particulièrement riche. On peut penser notamment aux formes de vie ralentie et de dormance, ainsi qu'aux réponses comportementales.

La diapause ne constitue pas une réponse au stress à proprement parler car elle est génétiquement programmée. De ce fait, elle peut être plutôt considérée comme une anticipation du stress. Cependant, les états de quiescence et de cryptobiose (conceptuellement proches de la diapause) sont toutes deux déclenchés par le stress (Bale et Hayward, 2010; Clegg, 2001; Hayward et al., 2005). La quiescence est une réponse physiologique et comportementale déclenchée par une perturbation (stress chaud ou stress hydrique principalement), facilement réversible, et générant un ralentissement du métabolisme (Danks, 2007; Tauber et al., 1985). La cryptobiose quant à elle est un état de quiescence poussé à l'extrême, permis par un ajustement drastique de la physiologie de l'organisme qui passe par l'entrée en anhydrobiose (déshydratation), cryobiose (congélation), ou anoxybiose (anoxie), associé à une activité nulle ou quasi-nulle et un état de vie latent (Clegg, 2001). Dans les deux cas, l'amélioration de la tolérance au stress est liée, notamment, à une diminution de l'activité métabolique, limitant la prise de l'environnement sur l'état de l'organisme en empêchant la mise en place d'un déséquilibre redox.

Le comportement peut aussi permettre une réponse plastique au stress, parfois très rapide, et souvent dépendante des capacités motrices de l'organisme (Feder et Hofmann, 1999). Le mouvement peut alors constituer une stratégie adaptative d'évitement de la contrainte, pouvant aller d'un simple déplacement au sein du microhabitat, à une migration ou même un évènement de dispersion (Ma et Ma, 2012). C'est une stratégie rentable en termes de valeur adaptative dès lors que le coût du déplacement est inférieur aux dommages encourus en cas d'absence de mouvement (Cremer et Heinze, 2003). Certains stress sont davantage compensés au travers d'une réponse comportementale. C'est le cas de stress tel que la chaleur, qui requièrent de la part des organismes un degré de plasticité phénotypique ne pouvant être atteint par l'organisme (Kearney et al., 2009; Mitchell et Hoffmann, 2010). Pour faciliter l'évitement, la réponse comportementale peut même s'associer à un polymorphisme. C'est ce qu'on peut retrouver chez certaines espèces de fourmis qui développent des formes ailées lors de conditions de vie défavorables (Cremer et Heinze, 2003).

1.6. Implications évolutives du stress

Le stress est au cœur de la vie des organismes, depuis le fonctionnement des organites au sein des cellules, jusqu'à la physiologie et le comportement des individus. Cette omniprésence n'est pas sans conséquences aux échelles écologiques et temporelles supérieures (Hoffmann et Parsons, 1997). Des systèmes plus larges tels que les populations et communautés sont en permanence affectés par de nombreuses pressions environnementales (Rouault et al., 2006; Wallner, 1987). Il en résulte des implications écologiques et évolutives globales, qui sont à la base du fonctionnement des écosystèmes (Somero, 2011; Somero, 2012; Steinberg, 2012). Si cette thèse ne s'attache pas à explorer ni approfondir ces aspects, il est important de garder à l'esprit ces éléments de discussion et d'analyse afin de conserver une vision d'ensemble.

Le stress tend à réduire la survie des organismes en leur imposant des contraintes, et un stress trop intense (aigu) ou long (chronique) peut grandement affecter des populations, voire pousser des espèces à l'extinction (Ceballos et al., 2015; Chevin et al., 2010; Somero, 2012). Pourtant, il ne doit pas être considéré comme un paramètre négatif par nature. Le stress va au contraire permettre de restreindre la niche écologique réalisée (cf fig. 1B), et donc favoriser la coexistence d'espèces et leur diversification au sein d'un même habitat (Hoffmann et Hercus, 2000; Somero, 2012). Il existe deux mécanismes principaux de l'adaptation au stress : la plasticité -comme mentionné précédemment- et l'évolution (Bijlsma et Loeschcke, 2005). Bien que la plasticité phénotypique soit une capacité déterminante et dont l'importance a longtemps été négligée (Gienapp et al., 2008; Merilä et Hendry, 2014), elle possède des limites physiologiques. Ces limites ne sont modifiables que sur le temps long, via des changements génétiques ou épigénétiques, permettant la mise en place d'une adaptation évolutive à proprement parler. Néanmoins il est possible d'observer des effets évolutifs en l'espace de quelques générations, notamment en conditions d'évolution expérimentale au laboratoire sur des espèces à cycle rapide (Bubliy et Loeschcke, 2005; Kubrak et al., 2017). On parle de phénomènes de microévolution pour désigner les changements soumis directement aux influences des stress. Par opposition avec la macroévolution (événements à l'échelle de l'espèce, spéciations...), la microévolution regroupe les changements génétiques se produisant à l'échelle de la population, faisant écho à des changements environnementaux et stress locaux. Les moteurs de cette microévolution sont classiquement la mutation, la sélection, les flux de gène, et la dérive (Steinberg, 2012). Tous vont pouvoir modifier les fréquences alléliques, voir apporter de nouveaux allèles potentiellement avantageux vis-à-vis des stress rencontrés. Tester expérimentalement ces phénomènes est difficile néanmoins, car les traits adaptatifs peuvent émerger de corrélations et de compromis génétiques ou physiologiques (épistasie, tolérance croisée, compromis survie/fécondité) qui sont environnement- et population-spécifiques, rendant les conclusions complexes (Bijlsma et Loeschcke, 2005; Sørensen et al., 2017). De plus, il est parfois difficile de savoir si un changement observé est réellement adaptatif

ou non (Merilä et Hendry, 2014). Par conséquent, la compréhension des dynamiques d'évolutions des traits de résistance/tolérance au stress demande encore à être complétée, et le besoin d'approches telles que les études d'associations pangénomiques (*Genome Wide Association Studies* en anglais) ainsi que les -omics (génomique, transcriptomique, protéomique) se fait ressentir (Gerken et al., 2015; Somero, 2012).

1.7. Le stress thermique

La température affecte profondément l'ensemble des organismes, car les processus physiologiques nécessaires à leur survie dépendent de cinétiques moléculaires et biochimiques thermosensibles. Ainsi, l'activité, la distribution et l'abondance des insectes sont toutes contrôlées à divers degrés par la température (Harrison et al., 2012). Pour ces raisons, la température dépasse probablement en importance l'ensemble des autres paramètres environnementaux (Harrison et al., 2012). Dans le contexte de réchauffement climatique global, il est donc impossible de passer à côté de cette problématique déterminante pour le maintien des espèces au sein de leurs écosystèmes (Bale et Hayward, 2010; Bale et al., 2002; Estay et al., 2014). Cela est d'autant plus vrai chez les insectes qui sont majoritairement des organismes ectothermes et poïkilothermes, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas générer leur propre chaleur corporelle, et doivent donc calquer leur température sur celle de l'environnement (Hochachka et Somero, 2002). Malgré les nombreuses stratégies de thermorégulation développées par les insectes, des températures excessivement froides ou chaudes les entraînent rapidement en dehors de leur préférendum thermique, c'est-à-dire en dehors de la gamme de températures que les organismes vont instinctivement choisir pour se développer. Comme présenté dans la figure 5, la courbe de performance des insectes en fonction de la température à ceci de particulier qu'elle est asymétrique (Estay et al., 2014). Cela a son importance car les écosystèmes terrestres thermiquement stables sont rares, et les organismes sont donc soumis à des fluctuations thermiques dont l'amplitude peut générer des dommages au-delà de ceux attendus (Colinet et al., 2015; Denny, 2017). La phase ascendante reflète l'amélioration progressive de la vitesse des processus métaboliques avec l'augmentation de température. Cette croissance s'arrête à un point que l'on qualifie d'optimum thermique (T_{opt}), et qui est suivi d'une décroissance relativement brutale aux fortes températures, liée aux dommages moléculaires rapidement induits (Willmer et al., 2004). En partie pour cette raison, la tolérance au stress chaud est un trait généralement peu variable, tandis que la tolérance au froid peut être ajustée à travers une importante plasticité phénotypique (*e.g.* Kellermann et al., 2012; Sørensen et al., 2016).

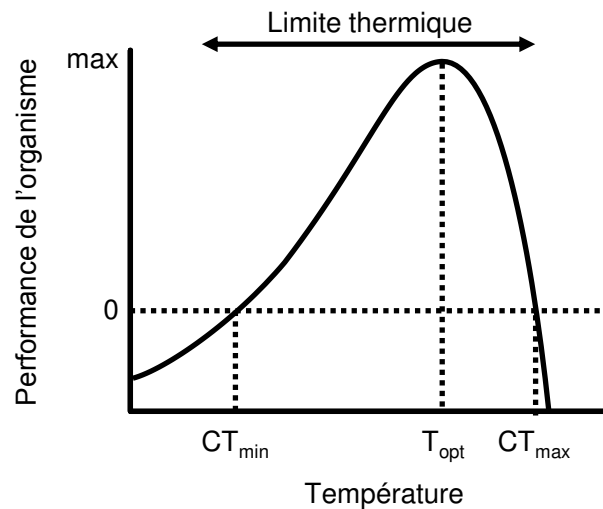


Figure 5 : Courbe de performance spécifique au facteur température. CT_{min} et CT_{max} indiquent respectivement les températures d'entrée en coma (ou torpeur) à la suite d'un stress froid ou chaud, et délimitent la limite thermique. T_{opt} indique la température de performance maximale. Adapté d'après Krenek et al. (2012).

L'échelle thermobiologique de Vannier permet de mettre en évidence les points clés qui régissent les différents équilibres physiologiques se succédant au sein des insectes en fonction de la température (fig. 6). On distingue généralement quatre catégories par ordre de capacité de tolérance du côté froid de l'échelle, que sont les *freezing tolerant* (qui peuvent survivre à la congélation au-delà du point de surfusion), *freezing intolerant* (qui ne survivent pas à la congélation au point de surfusion), *chill tolerant* (qui survivent aux températures en deçà de la température de coma, ou torpeur), et *chill sensible* (qui survivent mal au coma) (Bale, 1993).

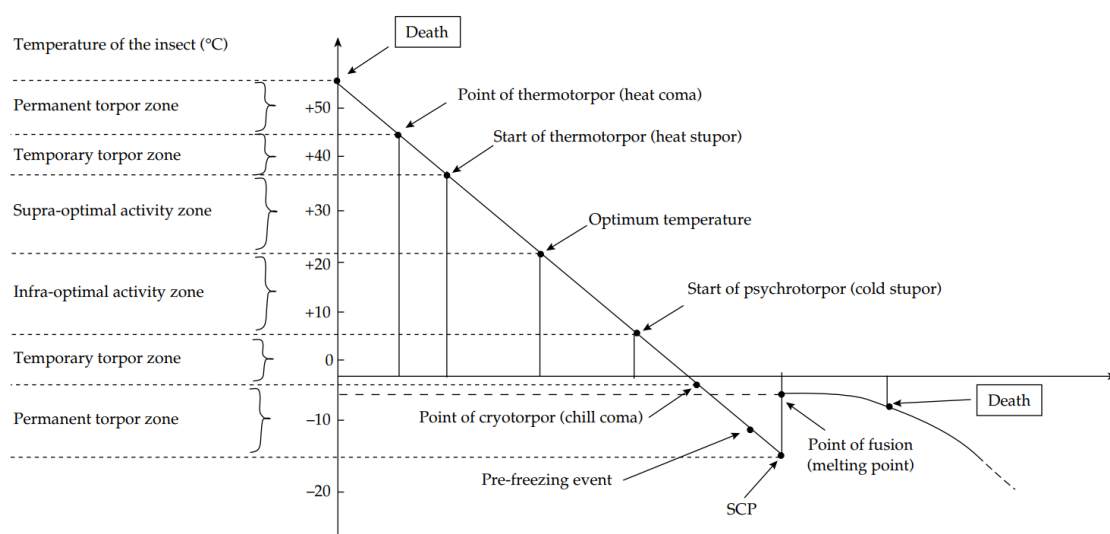


Figure 6 : Echelle thermobiologique générale des insectes intolérants à la congélation. SCP : supercooling point, ou point de surfusion. Pour la limite thermique basse, seule la stratégie *freezing intolerant* est présentée. D'après Vannier (1994).

Une partie dédiée au stress thermique est développée ultérieurement (partie 5.3) pour détailler la biologie thermique de *Drosophila melanogaster*, le modèle d'étude de cette thèse.

3. La nutrition chez les insectes

3.1. Ecologie nutritionnelle

Les insectes occupent une place de choix dans la quasi-totalité des environnements terrestres. L'essentiel de leur activité au sein des écosystèmes s'organise autour de la consommation de ressources alimentaires (herbivorie, prédation, parasitisme, saprophagie). Bien que la structure des populations d'insectes soit sensible aux pressions que les niveaux trophiques supérieurs lui imposent (effets *top-down* des ennemis naturels), il apparaît que les effets de la ressource nutritive (effets *bottom-up*) soient quantitativement plus importants (Kos et al., 2011). En effet, la capacité des insectes à convertir leur alimentation en capacité de reproduction et de croissance est déterminante pour leur succès écologique (Harrison et al., 2012). Pourtant, la nutrition est une thématique qui a longtemps reçu relativement peu d'attention, freinant la compréhension fine de l'écologie des insectes (Scriber et Slansky, 1981).

Pourquoi s'intéresser à la nutrition ?

La nutrition représente pour l'individu la ressource nécessaire à 1) l'intégralité de l'anabolisme et 2) la production d'énergie pour cet anabolisme, via le catabolisme (Chown et Nicolson, 2004). Chez les insectes, la diversité des régimes alimentaires est à l'origine d'un large éventail de modes de digestion et d'adaptations facilitant l'alimentation sur des substrats parfois très spécifiques. On peut penser aux structures permettant de maximiser l'acquisition des acides aminés pour les homoptères suceurs de sève, aux pièces buccales des nématocères, ou encore aux enzymes spécialisées dans la digestion de cellulose chez certains xylophages (Terra, 1990). En se restreignant aux insectes phytophages (la majorité des insectes), il est toutefois possible de résumer les principales caractéristiques des différentes étapes du cycle nutritionnel, depuis la composition de la nourriture jusqu'à l'excrétion.

La nourriture végétale se compose généralement d'eau, de molécules simples qui ne nécessitent pas de digestion (glucose, acides aminés, sels minéraux), de macromolécules complexes qui nécessitent une digestion (protéines et lipides), et enfin de macromolécules qui ne peuvent être assimilées (cellulose) ou sont toxiques pour l'organisme (tanins, nicotine) (Harrison et al., 2012). Une large partie des composés digérés (carbohydrates, lipides) est stockée dans différents tissus de l'organisme sous des formes polymérisées (glycogène et triglycérides généralement) pour être redistribués afin de produire de l'ATP via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. L'ATP est la molécule au cœur du métabolisme énergétique, puisqu'elle va permettre le

fonctionnement de toutes les protéines à activité ATPase. Sa présence est indispensable aux fonctions musculaires, au transport membranaire, et à la synthèse de protéines (Harrison et al., 2012). L'organe de réserve principal chez les insectes est le corps gras (Arrese et Soulages, 2010). C'est un organe aux rôles complexes qui ne se limitent pas à l'accumulation de nutriments excédentaires sous forme de graisse et de glycogène. Il est aussi impliqué dans la biosynthèse de nombreux composés (protéines de l'hémolymphe, métabolites circulants) et joue un rôle majeur dans le métabolisme intermédiaire. L'action du corps gras est « stade de développement-spécifique », déclenchant l'accumulation de réserves majoritairement au stade larvaire et la vitellogenèse chez les adultes (Arrese et Soulages, 2010). Cela est permis par une capacité à intégrer les signaux moléculaires hormonaux provenant de tout l'organisme, ainsi qu'une capacité à percevoir l'état des réserves en nutriments. En particulier, la voie de signalisation *target of rapamycin* (TOR) affecte largement le corps gras, avec des conséquences sur la régulation du développement et de la croissance (Park et al., 2006). De la même façon, c'est la sensibilité aux nutriments du corps gras qui va définir les seuils minimaux de nutriments nécessaires aux changements de stades (larvaires, puis imago), et donc l'entrée en métamorphose par exemple (Arrese et Soulages, 2010; Mirth et Riddiford, 2007).

L'excédent en acides aminés qui n'est pas utilisé par l'anabolisme, ainsi que les déchets protéiques issus du métabolisme cellulaire (protéines dysfonctionnelles ou dénaturées), sont regroupés sous le terme de déchets azotés. Ils sont désaminés dans le tube digestif afin d'en convertir une partie en carbohydrates réutilisables, générant au passage de l'ammonium (Harrison et al., 2012). L'ammonium est cytotoxique, et peut être directement excrété par l'intestin postérieur ou converti en acide urique ou en allantoïne par le corps gras (Bursell, 1967; Weihrauch et al., 2012). Ces produits sont généralement excrétés par la suite, mais quelques études suggèrent qu'ils puissent servir à des fonctions bénéfiques pour l'organisme, en intervenant par exemple comme antioxydants ou osmolytes compatibles (Andersen et al., 2010; Hilliker et al., 1992; Yancey, 2005). Chaque espèce possède ses propres ratios de dérivés azotés excrétés (ammonium, ammoniac, urée, acide urique...), ce qui est à l'origine de connaissances parfois incomplètes ou contradictoires à ce sujet (O'Donnell et Donini, 2017). La nutrition permet aussi de réguler l'équilibre osmotique de l'organisme, via l'absorption d'ions et la réabsorption d'eau au niveau de l'intestin postérieur et des tubes de Malpighi, qui occupent ici la fonction rénale (Phillips et al., 1987).

La nutrition dicte en grande partie la vie d'un organisme. Elle peut être un facteur limitant de la bonne poursuite du développement ou de la reproduction, car ce sont des processus demandant beaucoup d'énergie et de nutriments de base, nécessaires à la biosynthèse. Pour décrire les forces et mécanismes qui régissent la nutrition, un certain nombre de concepts ont été développés.

Les principaux concepts de l'écologie nutritionnelle

L'écologie nutritionnelle est une discipline à la croisée de nombreux domaines de la biologie, incluant le comportement, la morphologie, la biologie du développement, la physiologie, les histoires de vie, l'écologie, et l'évolution (Raubenheimer et al., 2009). C'est une discipline qui se veut intégrative, en mettant en avant les aspects mécanistiques et fonctionnels de la nutrition. Cette démarche est pertinente, dans la mesure où tous les aspects de la nutrition ne sont compris que de façon partielle s'ils sont traités séparément, mais elle est aussi très complexe à mettre en œuvre (Simpson et Raubenheimer, 2012). Aussi, un certain nombre de concepts doivent être explicités afin de donner un cadre aux interactions organisme-environnement et les modéliser. On doit l'essentiel de la formalisation de l'écologie nutritionnelle moderne à David Raubenheimer et Steven J. Simpson, et cette partie se veut donc un condensé de leurs travaux.

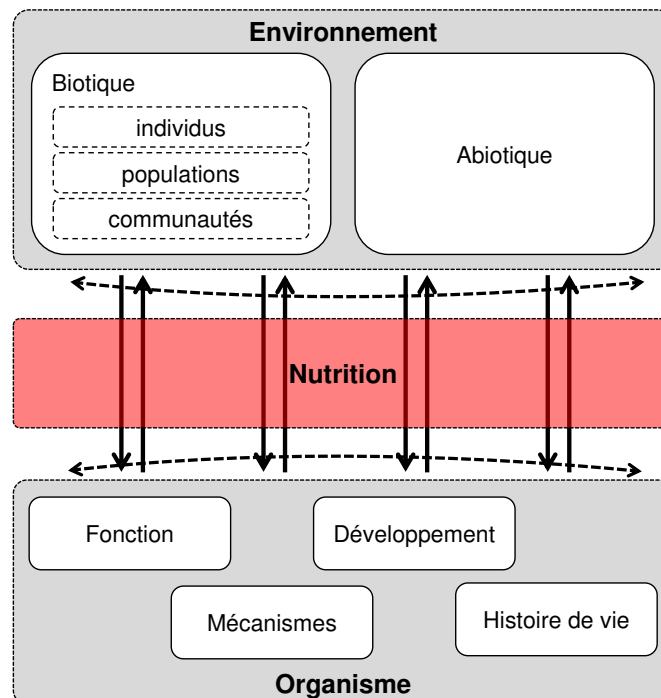


Figure 7 : Schéma conceptuel d'un cadre intégratif d'écologie nutritionnelle. Les différents aspects d'un organisme sont en interaction avec l'environnement biotique et abiotique à travers la nutrition. Les compartiments représentés s'influencent mutuellement. L'environnement affecte le phénotype de l'organisme (flèches descendantes), mais l'organisme possède lui aussi une influence sur l'environnement (flèches ascendantes). Les flèches pointillées indiquent la prise en compte d'interactions à l'intérieur de l'environnement ou à l'intérieur de l'organisme. Adapté d'après Raubenheimer et al. (2009).

Comme représenté dans la figure 7, il est possible d'aborder l'écologie nutritionnelle en se concentrant sur l'organisme, l'environnement, ou la nutrition. Les études centrées sur l'organisme s'intéressent principalement aux flèches descendantes, c'est-à-dire à la manière dont différentes variables (issues de l'environnement, de la nutrition ou des deux) vont influencer l'organisme, son phénotype, son comportement, ou, sur le plus long terme, ses adaptations. D'autres études

adoptent une approche inverse, et tentent de comprendre comment des phénotypes individuels peuvent modifier les communautés au sein de l'environnement (Schmitz, 2008; Simpson et al., 2006). Travailler avec des nutriments dont la composition est définie et connue (nutriments explicites) permet de caractériser plus facilement le rôle de chaque nutriment pour l'organisme, dans une condition environnementale donnée. C'est une approche dont les apports sont potentiellement très intéressants car elle permet 1) de générer des conclusions sur des nutriments précis et non sur des aliments complexes qui ne sont pas généralisables, et 2) de se détacher des *a priori* sur les effets de tels ou tels nutriments en proposant des protocoles expérimentaux exhaustifs ne nécessitant pas d'hypothèses fortes (Raubenheimer et al., 2009).

Un certain nombre de modèles ont été développés afin de décrire le cadre conceptuel gouvernant les choix de nourriture et/ou les effets de l'alimentation sur les organismes. La théorie de la recherche de nourriture optimale (*optimal foraging theory*) est une des premières approches au problème (Pyke et al., 1977). Elle considère que le résultat de tous les choix nutritionnels se pose comme la résolution d'une équation bénéfices – coûts, dont l'unité peut être la valeur sélective, la survie, ou encore l'énergie. Cette approche a montré une grande efficacité, mais ne permet pas de décrire individuellement les effets des différents nutriments composant la nourriture, et le choix de l'unité des coûts/bénéfices reste arbitraire. C'est pourquoi elle a aussi reçu de vives critiques (Pierce et Ollason, 1987). La théorie classique de l'écologie nutritionnelle quant à elle part de l'observation que les organismes arrivent à choisir des alimentations aux ratios de nutriments permettant la meilleure utilisation de la nourriture et maximisant sa conversion en biomasse (Waldbauer et al., 1984). Elle propose de comprendre ces choix pour la performance de l'organisme sous forme de bilan de divers indices (consommation, digestibilité, efficacité de conversion), à la lumière de la composition en nutriments mais aussi des facteurs environnementaux non-nutritionnels pouvant entrer en ligne de compte (Raubenheimer et al., 2009; Slansky et Rodriguez, 1987). La théorie classique ne permet cependant pas de modéliser plusieurs unités ou « monnaies » faisant office d'approximation pour la valeur sélective. C'est au contraire ce que permettent respectivement les théories de l'écologie stœchiométrique (*ecological stoichiometry*) et de nutrition géométrique (*geometric framework*). L'écologie stœchiométrique envisage des écosystèmes modélisables uniquement à travers des flux d'énergie et de constituants élémentaires (carbone, azote, et phosphore principalement), assimilables à un grand jeu de vases communicants (Elser, 2006). C'est une approche complète, pratique pour les échelles larges (écosystème), mais qui nécessite de beaucoup simplifier les phénotypes des organismes et qui établit de conclusions sur la base de la composition brute en nutriments des organismes, ce qui ne prend pas en compte les interactions éventuelles entre nutriments. Enfin, la nutrition abordée par le cadre géométrique est probablement la méthode la plus adaptée aux questions posées au cours de cette thèse. Elle imagine un espace multi-dimensionnel, dont chaque dimension représente un

composant nutritionnel et dont l'unité de « monnaie » est flexible (Simpson et Raubenheimer, 1995; Simpson et Raubenheimer, 2012). Par exemple, il est possible de représenter sur un graphique la fécondité d'un organisme en fonction du contenu en carbohydrates et en protéines de son alimentation (axes x et y, voir fig. 8). Cela permet de répondre à un très large panel de questions organisme-centrées, virtuellement sans limite ni dans les variables explicatives, ni dans la variable à expliquer (Raubenheimer et al., 2009).

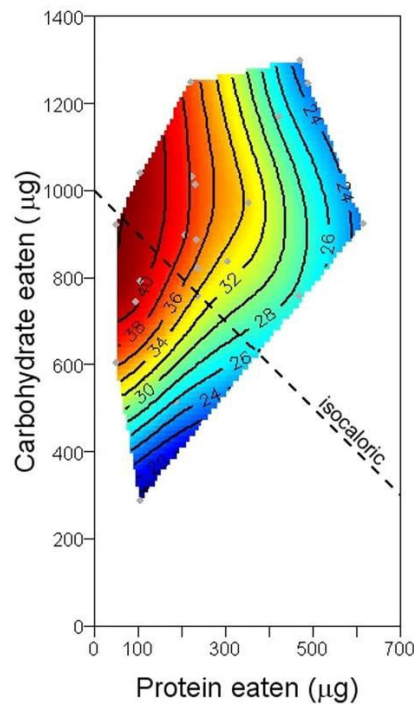


Figure 8 : Surface de réponse de la longévité d'un organisme (ici *D. melanogaster*) en fonction à la fois de la quantité de carbohydrates et de la quantité de protéines ingérées. La ligne pointillée noire correspond à un cline isocalorique. Exemple tiré de Lee et al. (2008).

Les concepts proposés jusqu'ici impliquent -quand ils sont nutritionnellement explicites- des alimentations artificielles. Cependant, dans la nature, malgré la diversité des régimes alimentaires et la variabilité à la fois de la quantité et de la qualité des ressources nutritives, les insectes arrivent à maintenir des apports conformes à leurs besoins. L'homéostasie nutritionnelle repose en fait sur la capacité des organismes à moduler leur physiologie et leur comportement de façon à 1) augmenter/réduire la consommation, 2) modifier les choix alimentaires, 3) ajuster la capacité de digestion afin de faire un meilleur usage des ressources à disposition, 4) ajuster l'allocation des ressources déjà digérées (Boggs, 2009; Chown et Nicolson, 2004; Simpson et Simpson, 1990). On appelle compensation nutritionnelle (*compensatory feeding*) le résultat de ce mécanisme.

Comme souvent en écologie, permettre à tous ces concepts de s'exprimer au sein d'une théorie unifiée qui minimiserait les angles-morts de chacun est un objectif majeur. Cependant, les modèles intégratifs restent encore à l'état de théorie actuellement, et seule la compilation de

différentes recherches dans des articles de revue de littérature peut laisser entrevoir les bénéfices que ces approches complexes pourraient apporter.

3.2. Conséquences des perturbations nutritionnelles

Plusieurs termes (privation alimentaire, jeûne, stress nutritionnel, carence, malnutrition) sont utilisés de façon interchangeable pour désigner des alimentations pauvres, des jeûnes prolongés, des jeûnes chroniques, ou même la privation d'un nutriment en particulier (Caro-Maldonado et Muñoz-Pinedo, 2011). Pourtant les conséquences de ces facteurs sont très variables et extrêmes, allant de l'extension de la durée de vie à la mort de l'organisme (Chippindale et al., 1996; Lee et al., 2008a; Rion et Kawecki, 2007). Lorsque la cellule manque d'apport en énergie ou en nutriments permettant le fonctionnement normal de l'anabolisme, plusieurs voies de signalisation sont affectées, telles que la voie TOR ou encore des facteurs de transcription (FOXO) couplés à des protéines kinases activées par l'AMP (AMPK), communes à une grande partie du monde vivant (Arsham et Neufeld, 2006; Caro-Maldonado et Muñoz-Pinedo, 2011; Greer et al., 2007). Cette réaction va permettre à la cellule d'inhiber sa synthèse de protéines, ajuster le transport d'énergie, et déclencher des mécanismes de survie comme l'autophagie afin de recycler les nutriments manquants pour les réattribuer aux fonctions vitales (Caro-Maldonado et Muñoz-Pinedo, 2011). Ce basculement marque le passage dans ce qui est souvent appelé le « mode survie » de l'organisme (Burger et al., 2007; Koyama et al., 2013; Rion et Kawecki, 2007). La physiologie générale de l'individu est remodelée afin de maximiser la survie, au détriment de l'investissement dans la reproduction (Partridge et al., 2005). Cependant, cette résistance est temporaire et ses effets bénéfiques disparaissent en cas de stress intense et prolongé, une fois que les réserves énergétiques sont consommées et que l'autophagie devient délétère (Caro-Maldonado et Muñoz-Pinedo, 2011). La mort cellulaire massive, par apoptose ou nécrose, peut alors conduire à la mort de l'organisme.

Nous avons vu que tout le métabolisme de l'organisme est soumis à l'alimentation. Lorsqu'une espèce s'éloigne de son optimum nutritionnel, ou lorsque les conditions environnementales deviennent stressantes, il est possible que les apports alimentaires deviennent insuffisants pour la maintenance des processus biologiques de base (Simpson et Simpson, 1990). Toutefois, le phénomène de compensation nutritionnelle permet aux organismes de tolérer des nutritons légèrement sous-optimales au moyen d'un compromis. Cela est particulièrement flagrant pour l'allocation des ressources : si le substrat est trop pauvre pour soutenir l'ensemble des fonctions de l'organisme, alors l'énergie allouée aux capacités de croissance ou de reproduction seront réduites (Boggs, 2009). Il est également possible que le compromis n'émerge pas de la compétition entre fonctions pour l'allocation de la ressource, mais plutôt du besoin de ressources

équilibrées (Boggs, 2009; Lee et al., 2008a). En effet, les organismes ont rarement la possibilité de n'ingérer qu'une partie d'un aliment donné (que les protéines, ou que les sucres par exemple). Si un nutriment limitant est rare, il peut générer collatéralement la surconsommation d'un autre nutriment potentiellement nocif ou toxique pour l'organisme, mais présent en grandes quantités (Fanson et al., 2012; Lee et al., 2008a; Skorupa et al., 2008). Ici, identifier le nutriment limitant comme seul paramètre d'importance est probablement une erreur, puisque la qualité et l'équilibre de la nourriture sont tout aussi cruciaux. Je présente donc dans les deux sous-parties suivantes quelques exemples des effets majeurs observés chez des insectes soumis à des stress nutritifs provoqués par des perturbations quantitatives, mais aussi qualitatives de leur substrat alimentaire.

Perturbations quantitatives

La perturbation quantitative de l'accès à la nourriture peut prendre plusieurs formes. Elle peut prendre la forme d'une consommation excessive de nutriments. Même si elle est surtout étudiée chez l'Homme et moins chez les autres organismes, la consommation excessive des nutriments peut être génératrice de phénotypes aux réserves énergétiques pathologiques (hyperlipémie, hyperglycémie) délétères pour le développement et la survie face aux stress (Colinet et al., 2013a; Musselman et al., 2011). La perturbation peut aussi émerger d'une restriction de l'accès aux nutriments. Le milieu nutritif peut par exemple être disponible moins souvent, être globalement plus pauvre, ou dans les cas les plus extrêmes être totalement indisponible, entraînant un jeûne. La restriction alimentaire modérée est probablement celle qui a attiré le plus l'attention de la communauté scientifique, puisque des effets positifs sur la longévité ont été observés d'abord sur des rats (McCay et al., 1935), puis dans un large éventail d'espèces, dont de nombreux insectes (Chippindale et al., 1993; Fanson et al., 2012; Joy et al., 2010). C'est un phénomène qui semble avoir une origine évolutive ancienne, bien qu'il n'ait pas été observé dans toutes les études testant l'effet (voir méta analyse par Nakagawa et al., 2012). Encore aujourd'hui, l'extension de la durée de vie des organismes en réponse à la restriction alimentaire reste partiellement incomprise, même si les indices concernant les mécanismes sous-jacents impliqués s'accumulent progressivement (Piper et al., 2011). Les premières observations d'extension de la durée de vie par la restriction nutritionnelle chez les insectes ont été faites sur *D. melanogaster* (Chapman et Partridge, 1996; Chippindale et al., 1993). Les conclusions des auteurs étaient généralement que le faible apport calorique entraînait une réallocation des ressources depuis la fécondité vers le maintien des fonctions somatiques et l'expression d'enzymes antioxydantes (Le Bourg, 2001; Pletcher et al., 2002; Sohal et Weindruch, 1996), limitant les effets du vieillissement conformément à ce qui est prédit par la théorie oxydative du vieillissement (Muller et al., 2007). La diminution de taille des individus était également rapprochée à la longévité accrue, ou au moins à des effets développementaux (Kapahi et al., 2004; Zwaan et al., 1991a). Les études suivantes ont toutefois ajusté et affiné ces conclusions. En effet, il est apparu assez rapidement que ce n'est pas la

restriction calorique mais bien la restriction en certains acides aminés (méthionine notamment) qui déclenche ou non les effets observés en termes de fécondité et de vieillissement (Grandison et al., 2009; Mair et al., 2005). De même, bien que le retard de vieillissement entraîne une diminution de fécondité, le retard persiste chez des individus stériles, remettant en cause le possible compromis fécondité/longévité jusque-là avancé (Mair et al., 2003; Partridge et al., 2005). Enfin, le rôle du développement est lui aussi minimisé, avec des travaux mettant en évidence que ni la taille ni la nutrition passée n'affectent la longévité (Giannakou et al., 2008; Mair et al., 2003; Tu et Tatar, 2003). Au final, il semble que les voies signalétiques de croissance (TOR et *insulin/insulin-like growth factor* ou IGF) soient au centre des phénomènes de vieillissement, arbitrées par l'ingestion d'acides aminés (Grandison et al., 2009). L'hypothèse que l'extension de longévité soit liée à des effets hormétiques est donc *a priori* écarté, d'autant plus que l'amplitude des différences de vieillissement sont incompatibles avec les faibles améliorations théoriquement permises par l'hormèse (Le Bourg et Rattan, 2008; Le Bourg, 2003). Enfin, certains auteurs ont proposé que les effets observés sur la longévité n'étaient pas tant des effets d'amélioration de longévité par la restriction calorique que des effets de détérioration de la longévité par le contenu calorique excessif des alimentations « contrôle » (Le Bourg, 2010b; Le Bourg and Minois, 2005). Si cela n'invalide pas nécessairement les travaux précédents en eux-mêmes (e.g. Partridge et al., 2005), ce point de vue change fortement leurs interprétations.

Même si la longévité n'est finalement pas dépendante des apports caloriques, il est tout à fait possible que d'autres traits le soient. En particulier, la restriction alimentaire et la privation alimentaire demeurent des stress modérés, et peuvent donc générer des effets hormétiques (Le Bourg et Rattan, 2008). Cela serait cohérent avec les patrons d'expression de gènes codant des protéines antioxydantes observés au cours de tels stress (Pletcher et al., 2002). De façon surprenante, la tolérance au stress oxydant est diminuée par la restriction alimentaire (Burger et al., 2007). A l'inverse, les individus soumis à une restriction alimentaire montrent une nette amélioration de la survie face au stress oxydant (Vigne et al., 2009). La résistance au jeûne est quant à elle améliorée à court terme par une restriction modérée, mais une restriction sur le long terme est négative (Burger et al., 2007). Dans ce cas, nous pouvons imaginer que la restriction à court terme déclenche un phénomène de réponse au stress (mobilisation des réserves, diminution de l'investissement dans la reproduction...), mais que la restriction au long terme est trop néfaste pour l'accumulation de réserves et gomme tout effet positif. Pour d'autres traits comme la tolérance au froid, les effets sont encore moins nets. Certains auteurs montrent que les régimes alimentaires riches sont bénéfiques sur le long terme (Burger et al., 2007), tandis que d'autres montrent que la privation alimentaire peut améliorer la tolérance des jeunes mouches (Le Bourg, 2013; Le Bourg, 2015). De façon similaire, les défenses immunitaires peuvent dans certains cas

être améliorées par la privation alimentaire (Brown et al., 2009; Burger et al., 2007), et dans d'autres cas non (Le Bourg, 2013).

Perturbations qualitatives

La contradiction apparente entre les études s'intéressant aux effets nutritionnels sur les traits phénotypiques autres que la longévité n'est pas si étonnante. Bien qu'il ne faille pas exclure que les traits testés soient effectivement variables et/ou génotype-dépendants (Piper et al., 2011), il est quasiment impossible de trouver une approche permettant de comparer ces études (restrictions ou privations non standardisées, traits testés différents...etc) (Lee et al., 2008a). Par exemple, la condition de restriction alimentaire utilisée par Burger et al. cité tout au long du paragraphe de la section précédente correspond presque à l'alimentation que j'ai utilisée en routine au cours de ma thèse. De plus, la majeure partie des études présentées ici testent en conditions expérimentales des substrats alimentaires plus ou moins dilués. Cela signifie que l'ensemble des composants de la nourriture sont raréfiés de façon homogène. Ainsi, les plans expérimentaux perdent en pouvoir explicatif puisque deux conditions expérimentales diffèrent par plus d'un paramètre, générant autant de variables confondantes. La véritable consommation de nourriture est souvent ignorée, empêchant de prendre en compte les phénomènes de compensation alimentaire. Il est alors possible que, comme pour la longévité, de nombreux effets considérés « caloriques » soient finalement des effets « protéines ». Le concept de nutrition géométrique permet de se pencher sur ce problème (fig. 8) (Lee et al., 2008a).

La nutrition géométrique a permis notamment de mettre clairement en évidence que la longévité et la reproduction ne semblent pas faire l'objet d'un compromis d'allocation de ressources chez la *Drosophile*, mais présentent simplement des surfaces de réponse divergentes. En faisant la différenciation entre apports de carbohydrates et de protéines (au lieu de ne considérer que les calories), il est possible d'observer beaucoup de combinaisons possibles entre faible et forte longévité/reproduction (Lee et al., 2008a; Simpson et al., 2017; Skorupa et al., 2008). Le compromis n'est donc pas issu d'un « choix » d'allocation, mais est intrinsèque aux ratios carbohydrates:protéines. Cela résout une partie des incohérences apparentes dans les études antérieures, inhérentes à la non-utilisation de la nutrition géométrique, et qui étaient vraisemblablement dues à des ratios carbohydrates:protéines incomparables. Lorsqu'ils sont soumis à un choix alimentaire, les insectes tendent à maximiser leur reproduction à l'âge adulte (Fanson et al., 2012; Jensen et al., 2012) ou leur temps de développement au stade larvaire (Rodrigues et al., 2015). L'équilibre entre nutriments est alors au centre des décisions nutritionnelles des individus (Corrales-Carvajal et al., 2016). Le déséquilibre vers une nutrition trop riche en sucres ou en protéines peut engendrer des phénotypes symptomatiques, respectivement obèses ou maigres (Skorupa et al., 2008; Wong et al., 2014). Sur le temps court, les insectes peuvent parfois compenser les déficiences alimentaires et éviter ces syndromes en

augmentant l'appétit envers le nutriment limitant, rétablissant ainsi un apport suffisant à un métabolisme normal (Raubenheimer et Jones, 2006; Steck et al., 2018).

La compensation comportementale n'est pas systématique, et son importance peut être limitée par rapport à l'ajustement direct du métabolisme et de la physiologie (Lee et al., 2004; Rodrigues et al., 2015). Comme déjà mentionné, la compensation peut générer des effets collatéraux indésirables quand elle provoque l'ingestion excessive de composés non-cibles (Botella et al., 1985; Fanson et al., 2012). Sur le temps long, les populations évoluant pendant de nombreuses générations sur des alimentations déséquilibrées peuvent développer des adaptations étonnantes. Par exemple, l'excès de protéines ou de sucres normalement stockés dans les organes de réserves afin de prévenir d'éventuelles privations futures est directement alloué à une croissance plus importante chez les individus issus de lignées en évolution expérimentale sur des milieux excessivement riches en l'un ou l'autre de ces nutriments (Vijendravarma, 2018; Warbrick-Smith et al., 2006). Dans le cas inverse, l'évolution sur milieu nutritif pauvre en sucres peut améliorer cette capacité de stockage (Warbrick-Smith et al., 2006). L'optimisation de la nutrition n'est pourtant pas toujours le facteur dirigeant le comportement des organismes. De façon intéressante, les larves de *Drosophila* favorisent l'action de se cacher en creusant le substrat (même pauvre ou déséquilibré) par rapport à la recherche d'une alimentation plus optimale (Schwarz et al., 2014). Cela est probablement la conséquence d'une capacité limitée à évaluer la qualité nutritionnelle d'un milieu à distance au-delà de son contenu en levures, surtout au stade larvaire (Corrales-Carvajal et al., 2016; Lee et al., 2008a).

Le déséquilibre nutritionnel peut se manifester au niveau des macronutriments (carbohydrates, protéines, lipides) comme décrit précédemment, mais il peut aussi intervenir à des niveaux plus fins. L'excès ou le manque en certains acides aminés peut entraîner des effets phénotypiques importants. La supplémentation en proline est relativement bien caractérisée pour ses effets bénéfiques sur la tolérance au froid et la résistance à la congélation des insectes (Košťál et al., 2011a; Košťál et al., 2012; Košťál et al., 2016). D'autres composés comme la méthionine ou certaines vitamines B affectent grandement la survie et la durée de vie des insectes. Il n'est donc pas exclu que les variations et déséquilibres micronutritionnels soient à l'origine de problèmes phénotypiques et physiologiques. L'étude de ces effets dans le cadre de l'approche géométrique est complexe, mais est facilitée par le développement d'outils, à commencer par des nutritionnels holidiques, c'est-à-dire dont la composition chimique est entièrement connue (Piper et al., 2014).

Dans cette section abordant le thème de la nutrition, j'ai volontairement omis de mentionner le rôle que peut avoir le microbiote (intestinal notamment) dans la nutrition des insectes, bien qu'il soit parfois déterminant. Pour des raisons de cohérence, et pour permettre d'introduire ces idées qui sont centrales dans la thèse, je développe ce volet dans la partie qui suit.

4. Les relations hôte-microbiote

Probablement parce qu'ils ne sont pas visibles à l'œil nu, et que les techniques moléculaires permettant de les étudier précisément ne sont apparues qu'à la fin des années 1970, les microorganismes et leurs interactions non pathogènes avec le reste du monde vivant sont longtemps restés ignorés. Pourtant, l'ensemble de la macrofaune vit dans un monde rempli de bactéries, à la diversité génétique et fonctionnelle écrasante, et que l'on retrouve en abondance dans tous les environnements terrestres (McFall-Ngai et al., 2013). Une telle ubiquité implique forcément un contact permanent entre micro- et macroorganismes, et il n'y a alors aucune raison pour que, de ce contact, n'émergent que des relations antagonistes. Ce constat a favorisé le développement à partir des années 1990 de travaux dédiés à la recherche de toutes ces autres relations possibles (symbiose, mutualisme, commensalisme...etc). Dire que de très nombreuses relations ont été mises en évidence serait un euphémisme. En fait il apparaît, au fil de l'avancée des recherches sur le sujet, que les relations hôte-microorganismes ne sont pas des événements isolés mais constituent bel et bien un aspect fondamental de la biologie des organismes et de leur évolution (McFall-Ngai et al., 2013).

4.1.L'holobionte

La zoologie a longtemps été abordée comme une science de l'étude des individus. Les cellules des organismes sont alors considérées comme des constituants élémentaires qui œuvrent à l'intégrité de l'entité supérieure qu'est l'individu. La découverte de l'omniprésence des interactions hôte-microorganismes a chamboulé cette vision. Dès lors que l'individu est considéré lui-même comme un écosystème-île abritant une certaine diversité d'organismes, même une discipline comme la physiologie devient dans une certaine mesure de l'écologie (Gilbert et al., 2012). En allant encore plus loin, la biologie cellulaire est aussi dans cette situation puisque ce sont des événements d'endosymbioses qui sont à l'origine de l'architecture et de l'organisation actuelle des cellules procaryotes comme eucaryotes (Gray et al., 1999).

On parle de microbiote pour désigner l'ensemble des microorganismes qui interagissent avec un hôte. Ce microbiote est principalement composé de bactéries, mais inclut aussi champignons, protistes, et archées (McFall-Ngai et al., 2013). Dans la nature, le microbiote est parfois tellement indissociable de l'hôte qu'il est difficile de tracer une limite à l'individu, ou même à l'espèce. En réponse à ce problème, une partie de la communauté scientifique a développé le concept d'holobionte. Puisqu'aucun individu n'est totalement dénué de microorganismes, il convient de considérer la somme de l'hôte et de son microbiote comme un unique superorganisme (Bosch et

McFall-Ngai, 2011). A ce titre, le microbiote est une caractéristique phénotypique de l'holobionte, et si elle est transmise d'une génération à l'autre et procure un quelconque avantage en termes de valeur adaptative, peut être soumise à la sélection naturelle (Rosenberg et al., 2009; Zilber-Rosenberg et Rosenberg, 2008). Dans ce contexte, la théorie de l'hologénome avance que l'unité biologique sur laquelle agissent les processus évolutifs est la somme des génomes de l'hôte et de son microbiote (le microbiome) (Rosenberg et al., 2009). Cette théorie est séduisante, car le potentiel adaptatif du microbiote est extrêmement grand. L'assemblage de la communauté de microorganismes peut largement se modifier en fonction des conditions environnementales, et le temps de génération des microorganismes favorise le transfert de gène horizontal ou encore l'apparition très rapide de mutations potentiellement adaptatives (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2018; Rosenberg et al., 2009; Soen, 2014). La « plasticité » du microbiote permet alors de tamponner les changements de l'environnement pour laisser à l'hôte le temps d'évoluer (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2018; Rosenberg et al., 2009).

Cependant, l'hologénome reste surtout un exercice de pensée intéressant, mis à l'épreuve de la réalité évolutive (Douglas et Werren, 2016). En effet, la théorie de l'hologénome se base sur des hypothèses fortes, et en particulier sur le fait que 1) le microbiote est stable et est transmis verticalement entre générations, et 2) le microbiote affecte forcément la valeur sélective de l'hôte (Rosenberg et al., 2009). Même si ces deux hypothèses peuvent être vraies dans le cas de certaines symbioses obligatoires, comme par exemple la symbiose puceron-*Buchnera aphidicola* (Baumann et al., 1995), ce n'est pas le cas de l'immense majorité des organismes formant la communauté du microbiote. En règle générale, le microbiote est transitoire et largement dépendant de l'environnement via l'acquisition horizontale de nouvelles espèces (Auchtung et al., 2018; David et al., 2014; Douglas et Beard, 1996; Erkosar et Leulier, 2014; Staubach et al., 2013). De plus, un nombre croissant d'études indique que certaines espèces sont dépourvues de microbiote résident, au moins à certains stades de leur développement (Hammer et al., 2017; Martinson et al., 2012; Sanders et al., 2017). Il est donc peu probable dans ce contexte qu'une relation privilégiée puisse s'installer entre l'hôte et son microbiote, autre qu'une relation neutre ou une relation proie-prédateur (Douglas, 2009). Enfin, il existe un grand nombre de preuves empiriques de divergences d'intérêt évolutif entre hôte et microbiote, ainsi même qu'entre membres du microbiote (Afkhami et al., 2014; Coyte et al., 2015; Jones et al., 2015). Ainsi, en conditions favorables, le microbiote peut être défavorable à l'espérance de vie de l'hôte (Bing et al., 2018). Plutôt que de parler d'holobionte, il est plus pertinent de présenter l'individu comme dans la figure 9, c'est-à-dire comme un micro-écosystème à l'intérieur duquel certains membres sont plus abondants que d'autres, certains sont résidents et d'autres transitoires, et enfin certains interagissent plus que d'autres avec l'environnement (Douglas et Werren, 2016). Dans ce cadre, il n'est pas surprenant qu'une partie des microorganismes entretienne des relations privilégiées

envers quelques hôtes spécifiques et inversement. Lorsque les associations préférentielles persistent et que les phylogénies de l'hôte et des microorganismes tendent à se superposer, on parle de phylosymbiose (Theis et al., 2016). Ce mécanisme de spécialisation progressive pourrait être à l'origine de nombreuses fonctions assurées par le microbiote, sans pour autant supposer de co-évolution ou de sélection à l'échelle d'un hypothétique hologénome (Brooks et al., 2016). Bien que quelques études abondent dans ce sens (Carrillo-Araujo et al., 2015; Gaulke et al., 2018; Groussin et al., 2017), ce n'est vraisemblablement pas un cas général, et une spécialisation parallèle peut tout à fait avoir une origine écologique (alimentation, mode de vie similaire...) chez des taxons phylogénétiquement éloignés (Martinson et al., 2017).

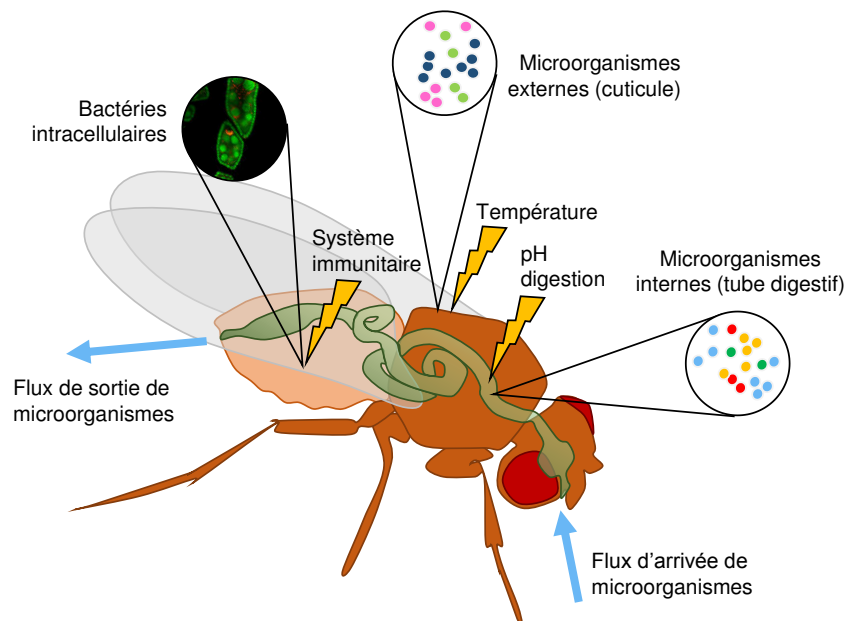


Figure 9 : Représentation du méta-organisme comme micro-écosystème, avec ses différentes niches écologiques, ses flux de population, et ses contraintes environnementales.

4.2. Les rôles du microbiote

Les insectes sont colonisés par des microorganismes (principalement bactéries et champignons), que ce soit au niveau de la surface de l'exosquelette (*e.g.* Anbutsu et al., 2017; Kaltenpoth et al., 2012), dans le tube digestif (*e.g.* Engel et Moran, 2013), ou à l'intérieur même des cellules (*e.g.* Braendle et al., 2003). La diversité de ce microbiote est souvent assez différente de la diversité de l'environnement extérieur direct, ce qui indique que les insectes peuvent -de façon active ou passive- filtrer les organismes. En fait, seul un nombre réduit de taxons sont couramment associés aux insectes. Cela inclut les bactéries *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, et *Bacteroidetes*, même si d'autres taxons peuvent ponctuellement développer des interactions (*e.g.* *Spirochaetae*, *Nasutitermes*) (Douglas, 2015). La sélection du microbiote est le résultat de la

combinaison de conditions physico-chimiques, de l'interaction avec d'autres microorganismes, du mode de transmission à la descendance, et de la compatibilité avec le système immunitaire de l'hôte (Douglas, 2015). L'association avec un hôte est une aubaine pour une bactérie, pour deux raisons principales : 1) elle va bénéficier d'un milieu relativement stable et tamponné, à l'abri du stress de dessiccation ou de rayonnements UV (pour les bactéries du tube digestif), fournissant un apport régulier de nourriture (Douglas, 2015) 2) elle va bénéficier d'un moyen de disperser sur de longues distances, et de manière non aléatoire (Barata et al., 2012). Cette association est toutefois à double tranchant, puisqu'une bactérie résidente lie sa valeur sélective à celle de l'hôte. Si l'hôte meurt, la bactérie perd ses avantages et risque de mourir également. Par conséquent, au cours de l'évolution certaines bactéries ont acquis la capacité d'agir sur le phénotype de leur hôte, leur permettant d'en améliorer la valeur sélective via l'expression de fonctions très diverses (Douglas, 2015).

Immunité

Les bactéries sont des corps étrangers dans le tube digestif des insectes. C'est un équilibre précaire entre la réponse pro- et anti-inflammatoire qui permet le maintien d'une homéostasie au niveau de l'épithélium intestinal. L'épithélium est la véritable surface d'échange privilégiée entre l'insecte et le milieu extérieur, et la perception de l'état de la communauté bactérienne et des éventuels pathogènes est importante pour réguler les fonctions immunitaires et développementales (Buchon et al., 2009; Ryu et al., 2008). Les modes de reconnaissance des différentes bactéries et l'évaluation de leur pathogénicité restent encore largement incompris, mais les molécules situées sur la surface des membranes bactériennes constituent de bons candidats (Lebeer et al., 2010). En particulier pour les bactéries mutualistes des Drosophiles, les acides téichoïques sont identifiés comme cruciaux dans le dialogue avec les entérocytes afin de déclencher les mécanismes de croissance (Matos et al., 2017).

Lorsque des agents pathogènes sont identifiés, toute une cascade de gènes et de régulateurs sont activés ou désactivés, produisant une réponse antimicrobienne inflammatoire. Elle se fait via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (initié par des enzymes comme les *dual oxidases*) et de peptides antimicrobiens (*antimicrobial peptides* AMP, initiées par la voie *immune deficiency* IMD ainsi que la voie *Toll*) (Ha et al., 2005; Ryu et al., 2008; Valanne et al., 2011). Il a été montré chez des Drosophiles dont un gène régulateur de l'IMD (*Caudal*) est inhibé, que la synthèse d'une grande quantité d'AMP peut drastiquement modifier la communauté du microbiote intestinal, causant l'apoptose des entérocytes et conduisant à la mort de l'organisme (Ryu et al., 2008). A l'inverse, chez des individus au gène *Caudal* fonctionnel, la présence d'un microbiote sain permet le retour à l'homéostasie et le contrôle des pathogènes à des niveaux plus raisonnables. En agissant sur les régulateurs de l'immunité, le microbiote intestinal permet ici d'arbitrer la réponse pro-inflammatoire (Ryu et al., 2008). Une autre étude vient appuyer ces

résultats avec des conclusions similaires dans le cas dans la transmission de la malaria par le moustique *Anopheles gambiae* (Dong et al., 2009). En effet, la présence de certaines bactéries affecte négativement le parasite *Plasmodium*, non pas via un antagonisme direct entre la bactérie et *Plasmodium*, mais par l'intermédiaire de l'activation du système immunitaire de l'hôte (Dong et al., 2009). Additionnellement, un microbiote sain pourrait aussi favoriser le renouvellement de l'épithélium intestinal, fondamental pour la défense contre les pathogènes (Buchon et al., 2009). L'immunité à l'interface bactérie/épithélium est une thématique qui fait l'objet de nombreuses recherches car les phénomènes qui s'y déroulent pourraient expliquer l'origine des maladies d'inflammation de l'intestin chez l'Homme (*inflammatory bowel diseases* IBD), qui sont encore assez mal caractérisées (Manichanh et al., 2012).

D'autres mécanismes liant immunité et microbiote existent, mais sont généralement très spécifiques à un mode de vie et à des besoins particuliers de l'insecte. On peut penser par exemple à la défense des pucerons contre les parasitoïdes grâce à la symbiose avec *Hamiltonella defensa* (Guay et al., 2009; Oliver et al., 2005). Un autre cas emblématique est la symbiose entre bactéries *Streptomyces* et les espèces de guêpe du genre *Philanthinus* et *Trachypus* (Kaltenpoth et al., 2012). Le temps de développement de la larve chez ces espèces est de l'ordre de l'année (Strohm et Linsenmair, 1999), ce qui constitue une longue période dans l'environnement clos et humide de leurs terriers, propice à l'installation de champignons et bactéries (Kaltenpoth et al., 2005). Pour pallier ce problème, les guêpes enduisent les parois de ce terrier d'une substance antimicrobienne et antifongique. Cette substance est en partie sécrétée par les bactéries symbiotiques que les guêpes conservent dans des cavités *ad hoc* situées sur leurs antennes (Kaltenpoth et al., 2005). L'émission de molécules aux propriétés antibiotiques n'est pas étonnante chez *Streptomyces*, puisque le groupe est largement reconnu précisément pour cette capacité (Béhal, 2000). Cependant, le fait que ces antibiotiques constituent la monnaie d'échange d'une symbiose est une caractéristique jusqu'ici unique (Kaltenpoth et al., 2005). Ces symbioses très spécialisées témoignent probablement de longues coévolutions, et ouvrent des perspectives sur l'importance que peut avoir le microbiote dans la vie d'un organisme et son évolution.

Comportement et reproduction

Le rôle du microbiote dans la reproduction est reconnu depuis relativement longtemps. La bactérie intracellulaire *Wolbachia sp* est sans doute l'une des plus répandues chez les insectes puisqu'on estime qu'elle est présente dans 66 % des espèces (Hilgenboecker et al., 2008). En fonction des espèces qu'elle infecte et des souches de *Wolbachia*, ses effets peuvent énormément varier, mais l'un des plus courants est la manipulation de la reproduction (Werren et al., 2008). La bactérie possède la particularité de ne se transmettre que par la femelle (les gamètes mâles sont trop petits pour la contenir), et du point de vue de la bactérie, il n'est pas intéressant que son hôte investisse de l'énergie dans de la descendance mâle. A travers divers procédés (féminisation, mâle-killing,

incompatibilité cytoplasmique, et parthénogénèse), *Wolbachia* peut donc parfois modifier le sexe-ratio d'une population vers une domination des femelles, ce qui lui permet d'augmenter ses chances de transmission (Werren et al., 2008).

Toutefois, l'influence du microbiote dans la reproduction de l'insecte n'est pas l'apanage des seules bactéries intracellulaires. Les bactéries intestinales peuvent aussi agir sur la reproduction via la sélection du partenaire. Chez la *Drosophile* par exemple, les individus élevés sur des milieux nutritifs similaires ont tendance à se reproduire préférentiellement entre eux (Heys et al., 2018a; Lewis et al., 2014; Lizé et al., 2014; Sharon et al., 2010). Sharon et al. attribuent cette préférence à un changement dans les hydrocarbures cuticulaires, véhicules d'information allélochimiques, qui serait causé par la présence ou l'absence de bactéries du genre *Lactobacillus* dans les différents milieux nutritifs testés. Ces travaux ont été répliqués avec plus ou moins de réussite (Leftwich et al., 2017; Najarro et al., 2015), donnant lieu à des débats portant principalement sur des détails méthodologiques (Leftwich et al., 2018; Obadia et al., 2018). Néanmoins, même s'il est indéniable que les liens de causalité méritent d'être approfondis et clarifiés, les problèmes inhérents à l'étude de paramètres difficilement contrôlables tel que le microbiote intestinal sont normaux, et ne doivent pas empêcher de continuer à explorer ces questions d'appariements préférentiels et de reconnaissance de parentèle. Ce phénomène reste particulièrement intéressant car il peut être à l'origine de spécialisations alimentaires voire de spéciations évolutives, même pour des populations vivant en sympatrie.

En dehors du comportement en lien avec la reproduction, le microbiote peut aussi influencer d'autres comportements chez de nombreux taxons (Ezenwa et al., 2012). Le comportement grégaire chez le criquet pèlerin, l'anxiété chez la souris, ou encore la bioluminescence chez certaines seiches sont tous des traits phénotypiques en partie sous contrôle du microbiote (Boettcher et al., 1996; Bravo et al., 2011; Dillon et Charnley, 2002). Les modifications du comportement alimentaire sont celles qui ont beaucoup retenu mon attention dans le cadre de cette thèse. Du point de vue de la bactérie, l'hôte doit principalement pouvoir lui fournir un substrat nutritif ainsi que permettre sa transmission entre générations. Pour ces deux aspects, les bactéries peuvent altérer le comportement alimentaire. L'acquisition de microorganismes chez l'espèce de punaise *Megacopta punctatissima* après l'émergence des nymphes est liée à l'ingestion de capsules contenant des bactéries spécifiques déposées par la femelle lors de la ponte (Hosokawa et al., 2008). Les individus pour lesquels ces capsules sont artificiellement retirées présentent un comportement d'exploration plus prononcé, et par conséquent coûteux en énergie (Hosokawa et al., 2008). On peut retrouver le même genre de procédé chez des espèces de vertébrés, comme certains iguanes. Chez ces espèces, la consommation de litière du sol ou de fèces est déclenchée par le besoin de sculpter la diversité bactérienne du tube digestif antérieur pour qu'elle soit en adéquation avec le stade de développement et les besoins alimentaires de

l'individu (Troyer, 1984). Enfin, chez la *Drosophile*, le microbiote peut aller jusqu'à modifier des choix alimentaires sous l'influence de nutriments spécifiques (Leitão-Gonçalves et al., 2017; Wong et al., 2017). Comme vu dans la partie portant sur la nutrition, la privation ou la restriction de certains composés (acides aminés le plus souvent) peut déclencher une réponse de compensation et augmenter l'appétit pour le nutriment en déficit. La présence de certaines bactéries du microbiote intestinal peut réduire l'amplitude du phénomène de compensation en protéines sans pour autant réduire l'activité de l'hôte, au contraire, puisque la fécondité est augmentée chez ces mêmes individus (Leitão-Gonçalves et al., 2017). Également, le microbiote peut changer l'attrance olfactive des mouches vis-à-vis des différentes espèces de bactéries présentes dans l'environnement. En fonction du type de communauté microbienne déjà présente et de l'âge auquel les mouches sont mises en contact avec les bactéries, le comportement alimentaire peut favoriser ou non les espèces bénéfiques à l'hôte (Wong et al., 2017). Ces observations soulèvent des questions sur les mécanismes qui lient la présence de bactéries et le comportement alimentaire associé, avec des implications fortes concernant la mise en place des microbiotes, leur transmission, et leur dispersion. Répondre à ces questions nécessite encore de nouvelles manipulations expérimentales, et pour le moment seules des pistes de réflexion sont proposées (Wong et al., 2015a). Parmi les mécanismes possibles, il est envisageable que le microbiote fournisse l'hôte en acides aminés essentiels ou agisse sur les voies de régulation de la nutrition et du développement (*e.g.* TOR) pour améliorer l'utilisation des acides aminés déjà ingérés (Douglas, 2009; Leitão-Gonçalves et al., 2017).

Nutrition et développement

Dans le paragraphe précédent nous avons vu que le microbiote peut influencer la nutrition à travers le comportement des insectes. Toutefois, il peut aussi agir de façon plus directe sur la digestion des nutriments, leur assimilation, leur stockage, et même leur utilisation (Douglas, 2009). De ce fait, toute la nutrition est étroitement dépendante des actions du microbiote. Tout d'abord, il est nécessaire de faire la distinction entre les microorganismes pouvant servir de nourriture, et ceux qui peuvent influencer la nutrition sans être eux-mêmes une ressource. Le premier cas relève de la simple interaction proie-prédateur (voir Keebaugh et al., 2018; Leitão-Gonçalves et al., 2017; Yamada et al., 2015), et c'est le second cas qui nous intéresse principalement, bien que la distinction entre les deux soit parfois floue (*e.g.* Rodrigues et al., 2011). On peut regrouper les fonctions du microbiote en trois catégories distinctes.

1) La première est la capacité du microbiote à synthétiser des molécules qui pallient l'incapacité de l'insecte à les produire de lui-même. L'azote, sous la forme de certains acides aminés, est souvent un des facteurs limitants de l'alimentation des insectes phytophages. Pour des alimentations naturellement pauvres en acides aminés comme la sève des végétaux, une association est souvent nécessaire, et même vitale (Baumann et al., 1995; Douglas, 2006). On

parle alors de symbiose, et les insectes suceurs de sève possèdent une longue histoire évolutive avec des bactéries qu'ils conservent à l'intérieur de cellules spécialisées que sont les bactériocytes (Braendle et al., 2003). Chez d'autres espèces, la provision en dérivés azotés est assurée via la capacité de fixer l'azote atmosphérique de certaines *Enterobacteria*. C'est le cas chez certaines espèces de lucanes ainsi que chez la mouche méditerranéenne par exemple (Behar et al., 2005; Kuranouchi et al., 2006). L'impact nutritionnel de la fixation atmosphérique est cependant discutable, le produit de la fixation étant l'ammoniac, un composé généralement toxique et excrété par l'organisme. Toutefois, cet ammoniac pourrait tout à fait être lui-même utilisé par d'autres bactéries, rendant l'azote de nouveau accessible sous des formes moins agressives. C'est du moins le cas pour une autre forme de déchet métabolique chez les insectes : l'acide urique. Plusieurs travaux montrent en effet que le microbiote peut être responsable de l'accumulation d'acide urique dans les tissus des cicadelles, des blattes, ainsi que des termites, et qu'il peut dans certains cas être mobilisé par ce même microbiote (Hongoh et Ishikawa, 1997; Mullins et Cochran, 1975; Potrikus et Breznak, 1981). Enfin, le microbiote peut directement améliorer l'extraction des acides aminés dans l'alimentation de l'hôte, comme c'est le cas dans la relation *Drosophile*-levures (Yamada et al., 2015). Outre les dérivés de l'azote, le microbiote peut fournir d'autres composés que le métabolisme des insectes est incapable de synthétiser. Les stérols en font partie, et quand ils sont absents de l'alimentation, c'est le mutualisme avec des espèces de levures qui peut prendre le relais (Nasir et Noda, 2003). Enfin, de nombreuses études se sont intéressées à la capacité du microbiote à fournir des vitamines du groupe B pour leur hôte (LeBlanc et al., 2013). Les premières études de ce phénomène portaient sur des espèces se nourrissant de sang, une alimentation pauvre en vitamines B, telles la mouche tsé-tsé (Nogge, 1976). Bien que les preuves expérimentales du phénomène soient peu étoffées (Douglas, 2009), les analyses génomiques attestent de la présence de symbiontes intracellulaires à l'intérieur de bactériocytes possédant des gènes pouvant synthétiser huit molécules de la famille des vitamines B (Akman et al., 2002). Chez la *Drosophile*, la synthèse de vitamines B par les bactéries du genre *Lactobacillus* ne fait plus de doute. Cependant, l'identité des molécules approvisionnées par le microbiote diverge selon les études (Wong et al., 2014). Le microbiote peut parfois tamponner l'absence d'acide folique (Blatch et al., 2010; Piper et al., 2014) et parfois l'absence de riboflavine (Wong et al., 2014). Ces résultats sont probablement le reflet de légères différences méthodologiques dans les substrats nutritifs et/ou d'effets souches, à la fois des mouches (Dobson et al., 2015) mais aussi des bactéries (Chaston et al., 2016).

2) La seconde catégorie d'effets regroupe toutes les fonctions de digestion et de détoxification. La très large majorité des insectes est phytophage, ce qui signifie qu'ils ingèrent des quantités importantes de polymères structuraux des plantes, très durs à digérer, tels que la lignine et la cellulose (Douglas, 2006). Une erreur commune est de croire que, comme les mammifères, les

insectes sont dépendants des bactéries pour digérer ces composés. Ce n'est qu'en partie vrai puisque beaucoup d'espèces sont capables de produire des cellulases grâce à leur propre génome (Davison et Blaxter, 2005). C'est donc souvent la combinaison des capacités de l'hôte et du microbiote qui permet de compléter le cycle de digestion. Les substrats alimentaires végétaux ne sont pas difficiles à digérer uniquement à cause des molécules de structures, les plantes ont aussi développé un impressionnant attirail de métabolites secondaires pour lutter contre l'herbivorie (tanins, caroténoïdes, terpènes...etc) (Freeland et Janzen, 1974). La détoxification de ces composés nécessite souvent des enzymes très spécifiques, et le microbiote représente une source de gènes potentiellement à même de résoudre ce genre de problème pour l'insecte (Dowd, 1992; Hammer et al., 2017). Pourtant, relativement peu d'études mettent en évidence un lien causal entre présence d'un microorganisme et l'élimination d'un composé toxique. Chez *Hypothenemus hampei*, un ravageur du café, la capacité à dégrader l'alcaloïde nocif qu'est la caféine est contrôlée par la présence d'un microbiote fonctionnel (Ceja-Navarro et al., 2015). De la même façon, le ver de farine *Tenebrio molitor* est plus sensible aux composés secondaires lorsqu'il est dépourvu de microbiote que lorsque son microbiote est sain, et sans que la perte du microbiote n'altère sa capacité de digestion pour autant (Genta et al., 2006). Outre ces exemples, beaucoup d'autres phénomènes de résistance aux composés secondaires des plantes pourraient être dus au microbiote sans que cela n'ait été testé (voir la revue de Hammer et Bowers, 2015).

3) La troisième catégorie d'effets regroupe les effets indirects du microbiote, via son influence sur les voies signalétiques de l'insecte. Pour le moment l'essentiel des travaux est centré sur la *Drosophile*, mais cela pourrait peut-être être généralisé à d'autres taxons d'insectes. Par le biais des voies TOR et IGF, toutes deux impliquées dans la croissance, le microbiote peut altérer le métabolisme énergétique de l'hôte (Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). Les répercussions de ces manipulations s'observent généralement au niveau de l'équilibre des différents types de réserve des individus (triglycérides et glycogène surtout, mais aussi les deux sucres libres que sont le glucose et le tréhalose) (Douglas, 2018; Wong et al., 2014). Ainsi, dans des conditions de stress nutritionnel, la présence de genres bactériens comme *Acetobacter* ou *Lactobacillus* permet de maintenir une croissance quasiment normale, quand les individus dépourvus de microbiote (également appelés « axéniques ») montrent une croissance largement réduite, voire totalement arrêtée (Ridley et al., 2012; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). A l'inverse des modèles vertébrés (Smith et al., 2007), les insectes axéniques présentent des niveaux de réserves nutritionnelles supérieurs à leurs homologues au microbiote conventionnel. Bien qu'il existe une forte dépendance à la composition de l'alimentation (Wong et al., 2014), à la composition du microbiote (Newell et Douglas, 2014), au sexe (Ridley et al., 2012; Wong et al., 2014), et au génotype des individus testés (Dobson et al., 2015), la tendance est toujours à une concentration supérieure en triglycérides et sucres libres chez les axéniques. Pour le glycogène, les données sont

moins consensuelles. La modification des réserves, et l'activation réduite des voies signalétiques de la croissance entraînent avec elles des retards développementaux. Par exemple, la masse larvaire, la masse adulte, la surface des ailes, et la latence avant formation des pupes sont tous augmentés chez les individus axéniques (Shin et al., 2011).

Stress

L'implication du microbiote intestinal dans une quelconque réponse au stress chez les insectes est une question de recherche qui n'a pour le moment reçue que peu d'attention.

Comme mentionné précédemment, le microbiote joue un rôle prépondérant dans la réponse au stress nutritionnel. Mais au-delà de ce stress nutritionnel, on ignore encore tout ou presque de l'implication qu'il pourrait avoir dans la réponse au stress oxydant, au stress osmotique, ou encore au stress thermique. Pourtant, les indices soutenant que de tels effets soient possibles ne manquent pas. Chez l'Homme, la présence de certaines Lactobacilles est associée à une plus grande capacité de production de HSP (Liu et al., 2014). On retrouve également des indices chez d'autres vertébrés. Par exemple, les bactéries peuvent améliorer la tolérance au stress oxydant chez les souris (Cani et al., 2008), et la tolérance au stress salin chez des poissons porte-épée (Hoseinifar et al., 2015). Un article récent décrit la quasi-extinction des saïgas provoquée par un stress thermique qui a transformé une bactérie bénigne du microbiote en pathogène virulent (Kock et al., 2018). La présence d'un microbiote sain est aussi la condition de la survie pour les coraux exposés aux augmentations de température (Ziegler et al., 2017).

Chez les insectes, la majeure partie des travaux microbiote-stress portent sur les bactéries intracellulaires facultatives des pucerons (*Rickettsia*, *Hamiltonella*, *Serratia*), qui améliorent la survie et la fécondité après exposition à un stress chaud (Burke et al., 2010; Montllor et al., 2002; Russell et Moran, 2006). La perte de performance serait ici due à un remaniement du métabolome de l'hôte, après la lyse des bactéries provoquée par l'exposition à un stress chaud aigu (Burke et al., 2010).

Quelques études fournissent de bonnes raisons de penser qu'un lien puisse aussi exister entre tolérance thermique et microbiote intestinal chez les insectes. Par exemple, chez le grillon, il existe une saisonnalité dans la composition du microbiote, qui de plus coïncide avec des changements physiologiques permettant la tolérance au stress froid hivernal (augmentation du nombre d'hémocytes, mélanisation accrue, diminution des protéines circulantes) (Ferguson et al., 2018). Ce phénomène n'est pas si étonnant dans la mesure où les insectes, n'étant pas endothermes, sont incapables de tamponner efficacement la température de leur tube digestif. Les bactéries sont alors soumises au stress thermique extérieur au même titre que l'hôte, et seules les espèces capables de survivre peuvent se maintenir dans la communauté. Il est très prématuré d'affirmer que ces bactéries adaptées au stress confèrent cette capacité à l'hôte, mais c'est une

piste qui mérite d'être explorée. Justement, chez la *Drosophile*, une approche similaire montre que l'inoculation de bactéries intestinales d'individus élevés au froid chez des individus élevés au chaud entraîne une diminution de la tolérance au chaud (Moghadam et al., 2018). Un contrôle précis de l'efficacité de la réinoculation manque encore pour pouvoir attribuer la cause de ce changement aux variations du microbiote, mais si cela se confirme, la capacité de conférer un phénotype sensible ou tolérant au stress par simple translocation du microbiote serait une sérieuse avancée avec de nombreuses applications possibles notamment en lutte biologique.

Même si les phénotypes de résistance sont encore peu caractérisés, les connaissances sur le mode de fonctionnement général du microbiote permettent de formuler différentes hypothèses sur les mécanismes pouvant être à l'origine des variations de tolérance au stress. L'expression des gènes de la réponse cellulaire au stress (codant pour les chaperonnes, les antioxydants...) est centrale dans la mise en place de la tolérance. Or, un grand nombre de gènes s'exprime différemment en fonction de la présence ou non d'un microbiote (Broderick et al., 2014; Combe et al., 2014). Parmi eux, une part non négligeable fait partie de la famille des gènes de stress, dont des HSP et des glutathionne transférases (Broderick et al., 2014). Par ailleurs, les gènes de stress sont surtout exprimés dans la partie antérieure du tube digestif, qui est aussi une zone hautement sensible aux dommages du stress froid. La perte de l'homéostasie osmotique et hydrique en cas de dépolarisation des membranes des cellules de l'épithélium par un stress froid peut rendre les parois du tube digestif poreuses et générer des dommages chez l'insecte (MacMillan et al., 2017; Overgaard et MacMillan, 2017). Une étude récente indique que le fonctionnement des pompes ioniques H⁺/K⁺ ATPase de l'épithélium intestinal est favorisé par le faible pH généré par l'activité du microbiote (Overend et al., 2016). L'absence de bactéries dans la partie proximale du tube digestif pourrait alors augmenter le pH et la sensibilité de l'hôte au stress froid. A l'inverse, il est parfois suggéré que la simple présence de bactéries agit comme agent glaçogène, augmentant la température du point de surfusion et par conséquent la mortalité face au stress froid (Lee, 1991). Il n'est donc pas étonnant que divers insectes vident le contenu de leur tube digestif (dont le microbiote) en prévision d'un stress froid, de manière à limiter la présence d'agents glaçogènes (Lee, 1991). D'ailleurs, l'utilisation de bactéries est même envisagée en lutte biologique, en exploitant cette capacité des bactéries à sensibiliser au gel (Tang et al., 2004).

Enfin, il est possible que les différentes modifications physiologiques causées par le microbiote comme le remaniement du métabolisme et l'activation de voies immunitaires vues précédemment affectent indirectement la tolérance au stress par effet de « tolérance croisée » (*cross-tolerance*) ou de « dialogue croisé » (*cross-talk*) (Sinclair et al., 2013). On sait par exemple que les réserves lipidiques et les métabolites circulants sont importants dans la réponse au stress, et ce sont précisément deux aspects largement dépendants du microbiote (Ridley et al., 2012; Wong et al., 2014). Ils déterminent entre autres la fluidité membranaire, la concentration en cryoprotecteurs,

et la présence d'agents glaçogènes, qui sont autant de facteurs responsables de la tolérance au froid chez les insectes (Clark et Worland, 2008). L'activation de la réponse immunitaire est souvent associée avec la réponse au stress, car toutes deux partagent des voies de signalisation communes (Sinclair et al., 2013). Le microbiote pourrait donc améliorer la tolérance au stress par effet collatéral de la stimulation immunitaire (Adamo, 2010).

Plutôt que d'améliorer spécifiquement la tolérance à certains stress, Soen propose que le microbiote permet d'améliorer globalement la valeur sélective de son hôte ainsi que sa capacité d'adaptation et d'acclimatation à un environnement changeant (Soen, 2014). Même si l'article reste spéculatif, il développe des idées intéressantes. Il postule tout d'abord que le microbiote est capable de réagir plus rapidement que l'hôte aux changements environnementaux (fig. 10). Le temps de génération très réduit des microorganismes est associé à un haut potentiel adaptatif, même à des échelles de temps inférieures à une génération de l'hôte. Par conséquent, des phénomènes adaptatifs à l'échelle du microbiote pourraient être « plastiques » à l'échelle du phénotype de l'holobionte. De plus, l'arrivée de microorganismes extérieurs, ou les changements d'abondance du microbiote natif, fournissent aussi un potentiel de plasticité phénotypique. A partir de ce constat, il suggère que le microbiote pourrait canaliser le phénotype dans un environnement stable, mais qu'à l'inverse, un environnement instable perturbe rapidement le microbiote, et augmente la variabilité phénotypique inter-individuelle. Lorsque le microbiote se transmet entre générations, il peut aussi transmettre ses propriétés induites sur le phénotype de l'hôte (Fridmann-Sirkis et al., 2014). Sur le long terme, on peut donc s'attendre à ce que la perturbation du microbiote par un stress ait des conséquences transgénérationnelles, pouvant même éventuellement affecter la trajectoire évolutive des individus. Selon Soen, le microbiote constitue donc une réserve de variation phénotypique rapide, qui possède son propre rythme évolutif, et qu'il faut considérer dans l'étude de processus évolutifs en conditions défavorables.

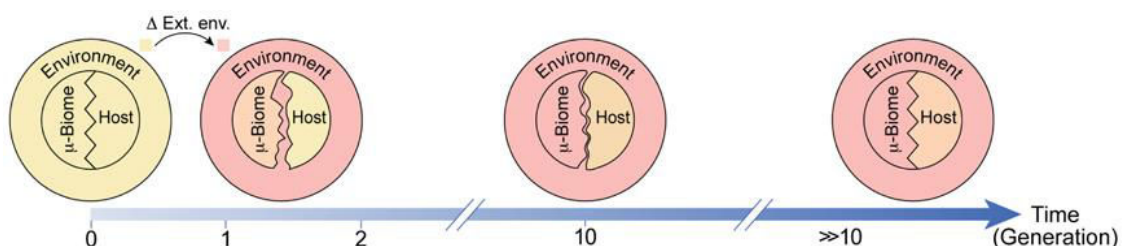


Figure 10 : Représentation schématique de l'adaptation progressive d'un holobionte à un changement environnemental. La transition de la couleur jaune vers le rose représente la modification de l'environnement, et l'adéquation de l'hôte et de son microbiote ces changements. Les changements rapides du microbiote génèrent une dysbiose de l'holobionte, qui se stabilise sur le très long terme. D'après Soen (2014).

5. Le modèle *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster Meigen (Diptera : Drosophilidae), communément appelée mouche du vinaigre, est un organisme modèle dans toutes les sous-disciplines de la biologie ou presque. C'est une espèce qui a été découverte en 1830 en Afrique sub-saharienne et dont la zone de répartition s'est depuis mondialement étendue. On la retrouve aujourd'hui jusqu'en Finlande pour la limite nord, et en Tasmanie pour sa limite sud (Keller, 2007). Cette omniprésence est largement due à l'activité de l'Homme, dont elle est à présent commensale. Des études suggèrent même que son aire de répartition ne pourrait pas être maintenue aussi large en absence d'êtres humains, notamment car certaines populations disparaissent entièrement durant l'hiver, et sont remplacées chaque année par de nouveaux événements d'introduction (Keller, 2007). Malgré sa dépendance à l'Homme, *D. melanogaster* démontre une grande capacité d'adaptation et de plasticité phénotypique (e.g. Chippindale et al., 1993; Gibert et al., 2000; James et al., 1997; Partridge et al., 1994). Combiné à un temps de développement court, un élevage aisé, un grand nombre de techniques de mesures de traits phénotypiques établies, ainsi qu'un arsenal d'outils permettant des études de génomique fonctionnelle, cela en fait un organisme idéal en écologie pour tenter de comprendre comment organismes et environnement interagissent.

Le cycle biologique de la Drosophile dure environ neuf jours à 25°C (Tyler, 2000). Etant un insecte holométabole, elle passe après la sortie de l'œuf par trois stades larvaires séparés par des mues, avant d'entamer une métamorphose sous une forme immobile que l'on appelle pupes au bout de 5 jours. Durant le stade larvaire, l'activité est dédiée à la recherche alimentaire. Les larves sont photophobes et s'enfoncent à l'intérieur de leur nourriture (naturelle ou artificielle). Cette photophobie est maintenue jusqu'à la métamorphose où les larves ressortent du substrat et se déplacent ("*wandering phase*") à la recherche d'un endroit propice pour la métamorphose. Après quatre jours sous forme de pupes et à 25°C, les adultes émergent. La maturité sexuelle est atteinte pour tous les individus mâles 12h après émergence (Strömnæs et Kvelland, 1962), et peut prendre jusqu'à trois jours pour les femelles. Il existe un fort dimorphisme sexuel (fig. 11A-B). Ceci permet une séparation aisée des deux sexes, généralement réalisée sous anesthésie au CO₂ (fig. 11D), un traitement qui s'avère stressant pour les mouches (Colinet et Renault, 2012).

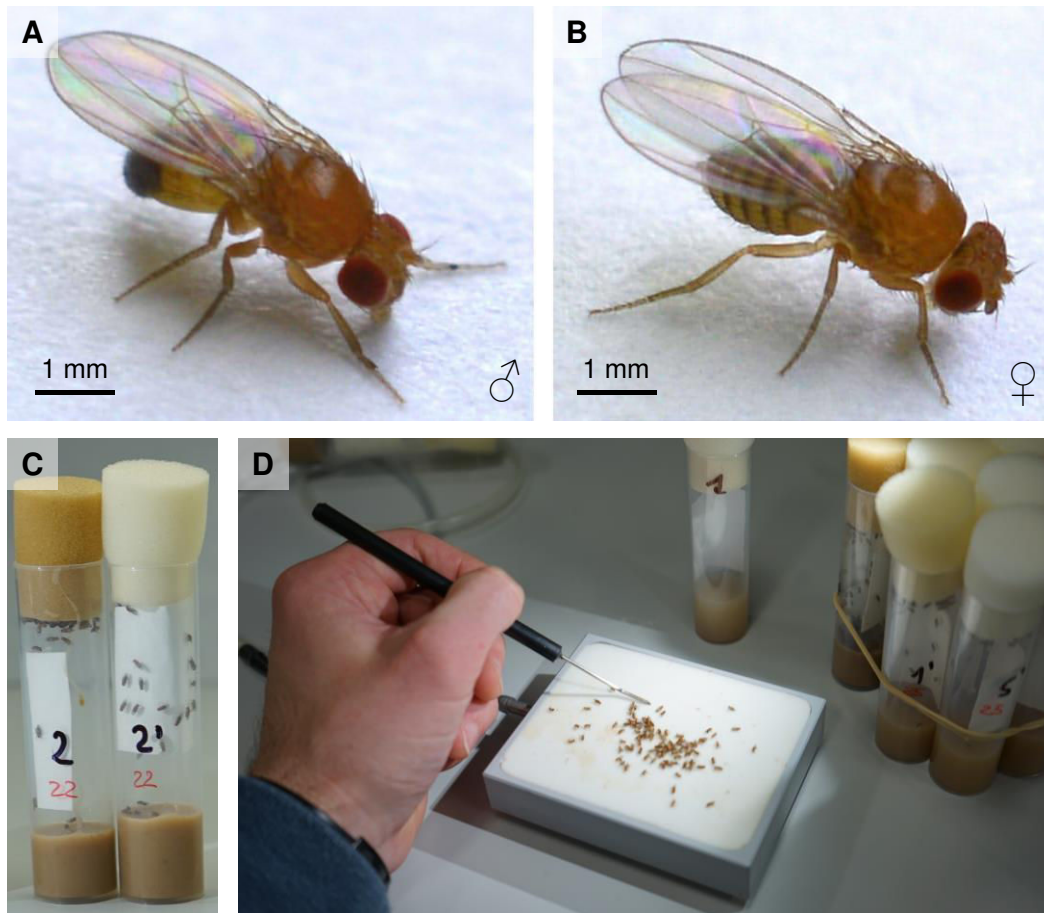


Figure 11 : Modèle biologique *Drosophila melanogaster*. (A) et (B) : photographies de *D. melanogaster* adultes mâle et femelle respectivement. (C) : Tubes de culture typiquement utilisés pendant les expériences au cours de la thèse et pour l'élevage de routine. (D) : photographie illustrant le tri des mâles et femelles sur un dispositif permettant l'anesthésie au CO₂. (Crédits photo : Romain Causse-Vedrines et Youn Henry)

Le sujet de cette thèse est à la croisée de trois thématiques qui sont toutes très fournies en termes de ressources bibliographiques chez *D. melanogaster* : la nutrition, le microbiote, et la biologie du stress thermique. Dans la suite de cette introduction, je donne un aperçu ciblé des connaissances actuelles sur ces trois thématiques chez *D. melanogaster*.

5.1. Nutrition chez *D. melanogaster*

Dans la nature, *D. melanogaster* vit et se reproduit principalement dans des fruits en décomposition. Ces fruits constituent des habitats dynamiques, dont la composition des nutriments (notamment la teneur en protéines et en glucides), le pH, ainsi que la concentration en produits de fermentation (éthanol, acide acétique), changent sous l'action progressive des communautés microbiennes (Gautier et al., 2008; Rozpędowska et al., 2011). Les levures, essentielles au processus de pourriture, sont source principale de protéines pour les mouches et colonisent la matière organique en décomposition de manière séquentielle (Fogleman et al., 1981;

Morais et al., 1995; Starmer et Phaff, 1983). En laboratoire, *D. melanogaster* peut se développer sur des milieux artificiels très simples, composés principalement de levures et de sucre (fig. 11C). La simplicité de ce substrat est extrêmement pratique, dans la mesure où il est possible de faire varier la disponibilité en levures ou en sucre, qui représentent respectivement les apports en protéines et en carbohydrates. De plus, ces deux composés possèdent des valeurs caloriques par unité de masse quasiment identiques (Min et al., 2007). Il est donc possible d'imaginer des protocoles expérimentaux faisant varier à la fois la qualité et la quantité de nourriture (Lee et al., 2008a). Les Drosophiles sont naturellement attirées par les levures, et la quantité de levures ingérées va souvent être l'étalon permettant aux individus de réguler leur consommation de nourriture (Carvalho et al., 2005; Fanson et al., 2012; Leitão-Gonçalves et al., 2017). Ainsi, lorsque la nourriture est pauvre en levures, la compensation nutritionnelle peut entraîner la surconsommation de sucres (Lee et al., 2008a). Cette prévalence des levures par rapport aux sucres est probablement l'héritage de la vie sur fruits en décomposition, dont la composition est très déséquilibrée vers les sucres. Le statut nutritionnel des mouches ne dépend pas uniquement des décisions individuelles. Bien que *D. melanogaster* ne soit pas une espèce eusociale, les choix de nutrition peuvent être collectifs (Lihoreau et al., 2016), ou émerger de la communication chimique entre individus (Abu et al., 2018; Venu et al., 2014). Les effets phénotypiques engendrés par des modifications de la nutrition peuvent être très variés, allant de la modifications des traits d'histoire de vie et de la morphologie (May et al., 2015; Partridge et al., 2005), à l'altération de traits de tolérance au stress (Andersen et al., 2010b; Colinet et al., 2013a; Lee et Jang, 2014; Sisodia et Singh, 2012).

La densité d'individus peut parfois constituer un obstacle à la nutrition. Les ressources alimentaires de *D. melanogaster* sont distribuées de façon discrète, à la fois dans le temps et dans l'espace (Nunney, 1990). Les adultes peuvent s'y regrouper et générer de fortes concentrations d'œufs à la faveur de phéromones d'agrégation (Wertheim et al.). Par conséquent, l'émergence simultanée de ces œufs va entraîner une surpopulation larvaire (Atkinson, 1979; Wertheim et al.). La surpopulation constitue un stress complexe, lié à la compétition interindividuelle par interférence, et qui se manifeste principalement à travers une restriction quantitative de la nutrition, une diminution de la qualité du substrat par accumulation de déchets métaboliques toxiques (Borash et al., 1998; Botella et al., 1985), et éventuellement une augmentation de la pression de cannibalisme (Vijendravarma et al., 2013). Aux fortes densités, des effets délétères sont observés : réduction de la masse, de la vitesse de développement, et de la fécondité (Barker, 1973; Borash et al., 1998; Kolss et al., 2009; Lints et Lints, 1969; Scheiring et al., 1984). Toutefois, la surpopulation peut aussi promouvoir la longévité et la tolérance aux stress (Borash et Ho, 2001; Shiotsugu et al., 1997; Sørensen et Loeschke, 2001; Zwaan et al., 1991a). Ces effets semblent assez similaires à ceux d'un stress nutritif modéré (Klepsatel et al., 2018), mais la

surpopulation étant un stress complexe, les observations pourraient tout aussi bien être partiellement dues à la toxicité du milieu ou aux interactions inter-individuelles (Belloni et al., 2018; Borash et al., 1998; Vijendravarma et al., 2013). Plusieurs mécanismes physiologiques cellulaires sont touchés par la surpopulation et pourraient expliquer les modifications phénotypiques observées. Le remodelage des membranes plasmiques vers une composition plus riche en phospholipides polyinsaturés ainsi que l'expression accrue d'HSP70 pourraient être de bons candidats (Moghadam et al., 2015; Sørensen et Loeschcke, 2001).

5.2. Microbiote intestinal chez *D. melanogaster*

La diversité du microbiote intestinal chez *D. melanogaster* a fait l'objet de plusieurs études, mais contrairement à l'homme, il est difficile d'établir un « *core microbiota* », c'est-à-dire un ensemble de taxons bactériens que l'on retrouve forcément dans l'ensemble des individus. D'un laboratoire à l'autre, d'une souche à l'autre, d'un substrat nutritif à l'autre, les communautés varient (Chandler et al., 2011; Staubach et al., 2013; Wong et al., 2011). Les facteurs qui façonnent le microbiote des mouches restent mal compris. Il est généralement admis que la mouche n'entretient pas de relation stable avec son microbiote, et qu'il est largement dépendant de la stochasticité environnementale (Douglas, 2018). Dans cette vision, le maintien de la diversité microbienne du tube digestif nécessite alors une constante ré-ingestion de nourriture pour se maintenir (Bing et al., 2018a; Erkosar et Leulier, 2014; Staubach et al., 2013). Plusieurs publications semblent pourtant attester qu'au moins une partie de la communauté est stable et résidente, même en environnement variable (Martinson et al., 2017; Pais et al., 2018). Cette stabilité pourrait provenir de la capacité des *Drosophiles* à filtrer et sélectionner activement leur microbiote à travers les conditions physico-chimiques de leur tube digestif et leur système immunitaire (Chandler et al., 2011). D'autres études suggèrent que la stabilité du microbiote peut émerger d'une adaptation non pas à l'hôte, mais à son substrat alimentaire (Martino et al., 2018).

Malgré la variabilité du microbiote, deux taxons bactériens sont très souvent dominants chez *D. melanogaster*, et généralement mutuellement exclusifs : *Lactobacillus* et *Acetobacteraceae* (Douglas, 2018). Ces deux taxons sont respectivement favorisés par une nutrition riche en polysaccharides ou riche en sucres simples (Douglas, 2018). Les autres bactéries représentent souvent moins de 20% de l'abondance totale (Staubach et al., 2013; Téfit et al., 2018), et appartiennent majoritairement aux phylums des *Proteobacteria*, *Firmicutes*, ou *Bacteroidetes* (Corby-Harris et al., 2007). Il est généralement admis que les individus de laboratoire possèdent une richesse spécifique inférieure à 70 OTU (*operational taxonomic unit*, notion que l'on peut assimiler à celle d'espèce pour les bactéries), descendant même régulièrement à moins de 10 OTU par individu (Wong et al., 2011). A l'inverse, les individus vivant dans la nature possèdent des

communautés plus riches, comprenant 100 à 200 OTU (Douglas, 2018; Martino et al., 2018). On attribue la cause de cette divergence à la diversité des régimes alimentaires dans la nature, comparée à la nutrition stable et pauvre en microorganismes du laboratoire qui tend à canaliser le microbiote vers une communauté réduite (Blum et al., 2013; Téfit et al., 2018). Qu'elles viennent du laboratoire ou qu'elles soient issues de l'environnement naturel, les mouches restent néanmoins des modèles significativement plus simples que l'Homme chez qui la richesse spécifique peut dépasser 3000 OTU (Tap et al., 2009). Cela conforte la *Drosophile* dans son statut d'espèce modèle permettant de comprendre les mécanismes biologiques du microbiote à l'intérieur de configurations simples, dans l'espoir de transposer ces connaissances à des situations plus complexes (Wong et al., 2011).

L'analyse des fonctions du microbiote intestinal est une thématique dont l'étude intensive est récente, et les articles sur *D. melanogaster* datent du milieu des années 2000 (e.g. Brummel et al., 2004). L'explosion du domaine est liée à l'arrivée d'outils génétiques permettant des approches d'écologie microbienne à l'échelle du tube digestif de mouches, via le séquençage haut débit des communautés de bactéries et levures qui sont les deux groupes d'organismes constituant le microbiote intestinal chez *D. melanogaster* (Chandler et al., 2011; Chandler et al., 2012). Cette explosion est aussi liée à la possibilité de générer des mouches axéniques, c'est-à-dire dépourvues de tout microorganisme contaminant, sans perturber la viabilité de l'organisme, et à un coût relativement réduit. Les mouches axéniques offrent une possibilité de comparaison avec leur équivalent conventionnel (dont le microbiote n'a pas été altéré), et permettent donc d'isoler l'effet « microbiote » sur les traits phénotypiques d'intérêt. L'étape suivante consiste à réinoculer les mouches axéniques avec des cultures pures de bactéries ou de levures (on parle alors d'individus gnotobiotiques) ou des mix définis, de façon à pouvoir associer des phénotypes à la présence d'un ou plusieurs microorganismes déjà connus (Ma et al., 2015). Si sur le papier ces opérations semblent simples, l'altération du microbiote et la réinoculation ne fonctionnent pas systématiquement, et le traitement de stérilisation n'est pas toujours anodin. Deux méthodes existent afin de générer des mouches axéniques : 1) utilisation d'un cocktail d'antibiotiques ajouté à la nourriture de développement, 2) déchorioniser les œufs et maintenir la stérilité du milieu. Les antibiotiques sont relativement sûrs d'utilisation, et vont drastiquement réduire l'abondance de bactéries. Cependant ils ont beaucoup de défauts. En particulier, ils peuvent avoir des conséquences non souhaitées sur la physiologie des organismes et retarder le développement (Ridley et al., 2013). De plus, le meilleur traitement antibiotique n'atteindra jamais une stérilité totale car il restera toujours les bactéries résistantes (Ridley et al., 2013), et l'efficacité des antibiotiques à éliminer les levures reste à démontrer. La déchorionisation quant à elle consiste à dissoudre le chorion de l'œuf avec un traitement à l'hypochlorite de soude diluée. Les œufs ainsi stérilisés ne peuvent plus être contaminés par les bactéries maternelles habituellement situées sur

le chorion. Pour assurer leur stérilité sur le long terme, l'ensemble du matériel d'élevage est lui aussi stérilisé, milieu nutritif inclus (Koyle et al., 2016). Il est généralement admis que la déchorionisation possède moins de désavantages que les antibiotiques, même si cette vision n'est pas toujours partagée (Heys et al., 2018b). La déchorionisation génère peu d'effets collatéraux, et peut générer des individus véritablement axéniques (Ridley et al., 2013). Son défaut majeur est de ne pas être une stérilisation active, et s'il reste quelques contaminants au lancement du développement, rien ne les empêche d'entièrement recoloniser l'environnement. C'est pourquoi il est préférable de contrôler l'efficacité du traitement. Un avantage immense des *Drosophiles* dans l'étude du microbiote est que les principaux genres bactériens constituant leur microbiote sont cultivables en laboratoire. La manière la plus simple de contrôler l'efficacité d'un traitement de stérilisation est donc de réaliser des étalements de broyats sur boîte de Petri.

5.3. Stress thermique chez *D. melanogaster*

D. melanogaster est une espèce ectotherme et poikilotherme, d'origine tropicale. En tant que telle, elle est pré-adaptée à des températures relativement hautes, et à l'inverse est plutôt sensible au froid (*chill suceptible*) dans les régions tempérées. La limite supérieure au-delà de laquelle les mouches tombent en coma est généralement située autour de 40°C, tandis que la limite inférieure se situe dans la tranche 4-6°C (Hoffmann et al., 2003). Cependant, le développement est interrompu bien avant d'atteindre ces températures, puisque en dessous de 10°C et au-dessus de 32°C, les mouches sont incapables de réaliser un cycle de développement complet (Chakir et al., 2002).

Contre-intuitivement, l'origine tropicale de *D. melanogaster* la rend particulièrement sensible au stress chaud (Tewksbury et al., 2008). En effet, les espèces tropicales sont des thermo-spécialistes adaptées à de hautes températures. Par conséquent, elles éprouvent des difficultés à tolérer des stress qui vont au-delà de leur préférendum déjà élevé (Deutsch et al., 2008). Bien qu'une acclimatation à 29°C améliore sensiblement la survie à un stress de 38°C chez *D. melanogaster* (Levins, 1969), l'effet n'est que de courte durée. Cette amélioration temporaire est vraisemblablement le résultat d'une *heat shock response*, qui augmente significativement la production de HSP, au coût d'une fécondité réduite (Krebs et Loeschcke, 1994). De façon intéressante, la longévité est améliorée par l'exposition régulière à ces petits chocs thermiques (Hercus et al., 2003; Le Bourg et al., 2001). Le fait que la principale réponse à l'exposition au stress chaud soit une expression accrue mais temporaire de protéines de stress, explique probablement le faible potentiel d'acclimatation thermique et donc de la plasticité phénotypique pour répondre durablement aux effets du réchauffement climatique chez cette espèce (Sørensen et al., 2016).

A l'inverse de la tolérance au stress chaud, la tolérance au stress froid est un trait plus plastique, et dont la variabilité s'explique beaucoup par la dépendance du phénotype aux conditions environnementales (Colinet et Hoffmann, 2012; Hoffmann et al., 2003). Les modalités de l'acclimatation sont déterminantes pour son efficacité : le stade de développement, les fluctuations thermiques, et la durée de l'acclimatation vont engendrer des réponses parfois très différentes (Hoffmann et al., 2003; Marshall et Sinclair, 2009). Les bénéfices de l'acclimatation au froid sont proportionnels à sa durée. Hori et Kimura, (1998) indiquent que les bénéfices maximaux de l'acclimatation au froid ne sont atteints qu'au bout de 16 jours (chez d'autres espèces de *Drosophiles* cependant). Il est alors possible de distinguer la préexposition longue (acclimatation graduelle, de l'ordre de quelques jours), des phénomènes d'endurcissement rapide (*rapid cold hardening*, de l'ordre de quelques heures) (Hoffmann et al., 2003). De façon intéressante, les différents types d'acclimatation peuvent parfois se cumuler. Par exemple, des individus acclimatés au froid sur le long terme (15°C) sont encore capable de présenter une réponse de type endurcissement au froid après un stress bref mais intense (0°C) (Colinet et Hoffmann, 2012). De la même façon, les individus acclimatés pendant leur développement présentent de meilleures survies à l'exposition à un stress aigu (-4.5°C) que les individus acclimatés de façon graduelle au stade adulte, mais sont moins performants pour la récupération après un coma froid (Colinet et Hoffmann, 2012). La diversité des réponses de *D. melanogaster* à l'acclimatation au stress froid reflète probablement à la fois la diversité des mécanismes physiologiques altérés par l'acclimatation (Colinet et Hoffmann, 2012; Colinet et al., 2016), et la diversité des types de mesures de tolérance thermique (Macmillan et Sinclair, 2011).

Comme chez de nombreuses autres espèces d'insectes, le stress thermique (froid principalement) entraîne un grand remodelage de la physiologie de *D. melanogaster*. La modification de la composition lipidique des membranes cellulaires afin de réguler leur fluidité (Overgaard et al., 2008), la réduction de l'activité des pompes K⁺/Na⁺ afin de conserver une homéostasie de charge avec l'hémolymphe (MacMillan et al., 2014), la réorganisation du métabolisme et l'augmentation des sucres circulants (Košťál et al., 2011b; Overgaard et al., 2007), l'accumulation d'osmolytes protecteurs (Olsson et al., 2016), ou encore l'expression plus importante de HSP (Colinet et Hoffmann, 2012) sont toutes des marques de plasticité phénotypique chez les *Drosophiles*. Ces altérations physiologiques sont des réponses ou des conséquences du stress thermique. Toutefois, une partie de ces modifications est également constatée en réponse à d'autres stress, tel que le jeûne ou à la dessiccation par exemple (Sinclair et al., 2007; Wang et al., 2004). Ainsi, la réponse au stress provoquée par un stress thermique peut permettre d'améliorer la tolérance à d'autres stress. Ce phénomène est appelé tolérance croisée (voir section 1.7 et Sinclair et al., 2013), et par ce processus, le froid est capable d'améliorer la tolérance à des stress aussi divers que la chaleur, le jeûne, l'hypergravité, ou encore la surpopulation (Le Bourg, 2013; Le Bourg, 2015; Sørensen

et Loeschcke, 2001). De façon intéressante, l'exposition à un stress froid modéré protège durablement les individus contre l'exposition au stress chaud (Le Bourg, 2016), alors que les bénéfices d'un endurcissement au chaud sont temporaires, ce qui témoigne de mécanismes physiologiques impliqués très différents.

En plus de l'intérêt lié à la compréhension des mécanismes physiologiques de la tolérance au stress, l'étude des stress thermiques ouvre la porte à de nombreuses questions d'écologie et d'évolution (Hoffmann et al., 2002). Par exemple, la tolérance au stress froid chez *D. melanogaster* en milieu tempéré passe notamment par la diapause reproductive, qui constitue une adaptation majeure permettant de survivre à l'hiver (Ohtsu et al., 1992; Schmidt et Paaby, 2008). La diapause étant partiellement sous contrôle génétique, l'apparition de clines latitudinaux de génotypes diapausants constitue un exemple intéressant de sélection (Schmidt et Paaby, 2008).

6. Objectifs et organisation de la thèse

La vie des insectes est rythmée par les contraintes environnementales qu'ils subissent. Les stress affectent bien sûr leur capacité à survivre, mais ils vont aussi affecter leur développement, leur fécondité, ou encore leur activité. La façon dont les insectes répondent à ces stress afin d'en minimiser l'impact est modulée par de nombreux paramètres qui ne sont pas encore tous compris. Deux de ces paramètres ont retenu mon attention au cours de cette thèse : le microbiote intestinal et la nutrition.

Le microbiote intestinal est un paramètre que l'on (re)découvre être impliqué très profondément dans la physiologie de l'hôte. Parmi les rôles du microbiote, on retrouve des fonctions affectant la nutrition, le métabolisme énergétique, ou encore le développement des individus. Toutes ont déjà été reliées à la capacité de tolérance au stress chez les insectes, indépendamment du microbiote. Il serait alors intéressant de pouvoir établir le lien manquant entre les modifications du microbiote et la tolérance au stress.

La nutrition possède de nombreux effets sur la physiologie des organismes. Bien que les conséquences de changements d'apports nutritionnels soient de mieux en mieux comprises, notamment grâce à la géométrie nutritionnelle, les stress alimentaires multifactoriels comme la surpopulation restent peu étudiés. Par exemple, l'amplitude et la cause des effets de surpopulation (restriction calorique vs accumulation de déchets métaboliques) sont encore peu décrits, et les conséquences des fortes densités sur la tolérance thermique sont à l'origine de résultats conflictuels.

Enfin, et c'est probablement le défi le plus ambitieux de la thèse, comprendre les interactions réciproques entre nutrition et microbiote intestinal constitue une opportunité de mieux appréhender leurs effets respectifs. La littérature montre que microbiote joue un rôle indiscutable dans l'assimilation, le stockage, et l'utilisation des ressources énergétiques, et intervient aussi dans les choix alimentaires des *Drosophiles*. Le microbiote affecte donc la nutrition. Cependant, la nutrition peut elle-même affecter le microbiote en retour. Par exemple, les études montrent que le microbiote de *D. melanogaster*, de par sa nature transitoire, est en partie dépendant des conditions environnementales puisque les communautés microbiennes changent en fonction du substrat à leur disposition. Peu d'études ont pu explorer comment nutrition et microbiote peuvent s'influencer mutuellement, et quelles en sont les conséquences phénotypiques du point de vue de l'hôte.

Le corps de cette thèse s'articule donc en deux chapitres, chacun subdivisés en deux articles, qui explorent tour à tour les relations hôte-microbiote-nutrition et leur influence sur le phénotype des

insectes, en insistant sur la tolérance au stress thermique qui est centrale chez ces organismes ectothermes. Les objectifs principaux sont de :

1) Caractériser les effets du microbiote intestinal sur la tolérance au stress thermique

Sachant que l'absence de microbiote génère des problèmes métaboliques (Wong et al., 2014) et une fragilité de l'épithélium intestinal (Ryu et al., 2008) chez *D. melanogaster*, et que ces traits sont importants pour la tolérance au stress thermique (MacMillan et al., 2017; Overgaard et al., 2007), nous faisons l'hypothèse que l'altération du microbiote réduit de façon globale la tolérance au stress thermique.

2) Comprendre l'interaction entre l'équilibre nutritionnel et le microbiote, et identifier la part de chacun de ces paramètres dans la variabilité phénotypique des individus

Sachant que le microbiote est largement impliqué dans la nutrition de l'hôte (Douglas, 2018), en particulier en acides aminés (Yamada et al., 2015), nous faisons l'hypothèse que les effets physiologiques et phénotypiques de l'altération du microbiote sont dépendants de l'alimentation. En particulier nous supposons qu'une alimentation riche en levure ne présentera pas de différence entre individus conventionnels et axéniques, mais qu'une différence peut apparaître dans les conditions les plus pauvres en levures, indépendamment de la concentration en sucres.

3) Observer les effets d'un stress nutritionnel complexe tel que la surpopulation larvaire sur les traits d'histoire de vie et les traits de tolérance au stress, et mettre en évidence les mécanismes physiologiques sous-jacents

Les effets de surpopulation sont variables d'une étude à l'autre, et en particulier l'amélioration de la tolérance au stress thermique aux fortes densités est sujette à débats (Arias et al., 2012; Loescheke et al., 1994; Sørensen et Loescheke, 2001). Sachant que la surpopulation représente principalement un stress nutritionnel, et que la restriction calorique modérée peut générer des effets hormétiques bénéfiques pour *D. melanogaster* (Le Bourg, 2015), nous faisons l'hypothèse que l'amélioration de la tolérance thermique est elle aussi un effet hormétique qui n'apparaît qu'à certaines densités larvaires. Nous faisons également l'hypothèse que la différence de tolérance est liée à un métabolisme différent d'une densité à l'autre.

4) Identifier les conséquences de la surpopulation larvaire sur le microbiote intestinal et sur les communautés bactériennes de l'environnement des larves.

Sachant que la surpopulation produit une quantité conséquente de déchets métaboliques (Borash et al., 1998; Joshi et al., 1996), et que les bactéries autant que l'hôte sont affectées

par leur toxicité (Winans et al., 2017), nous faisons l'hypothèse que les quantités de déchets métaboliques augmentent avec la densité larvaire, et que ces changements sont associés à un remaniement important des communautés de microorganismes, aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur du tube digestif. Etant donné le mode de vie particulier des larves, exclusivement centré autour de l'ingestion de substrat, nous faisons l'hypothèse que son microbiote intestinal est similaire à celui du milieu extérieur.

Ces différents objectifs sont récapitulés dans la figure 12.

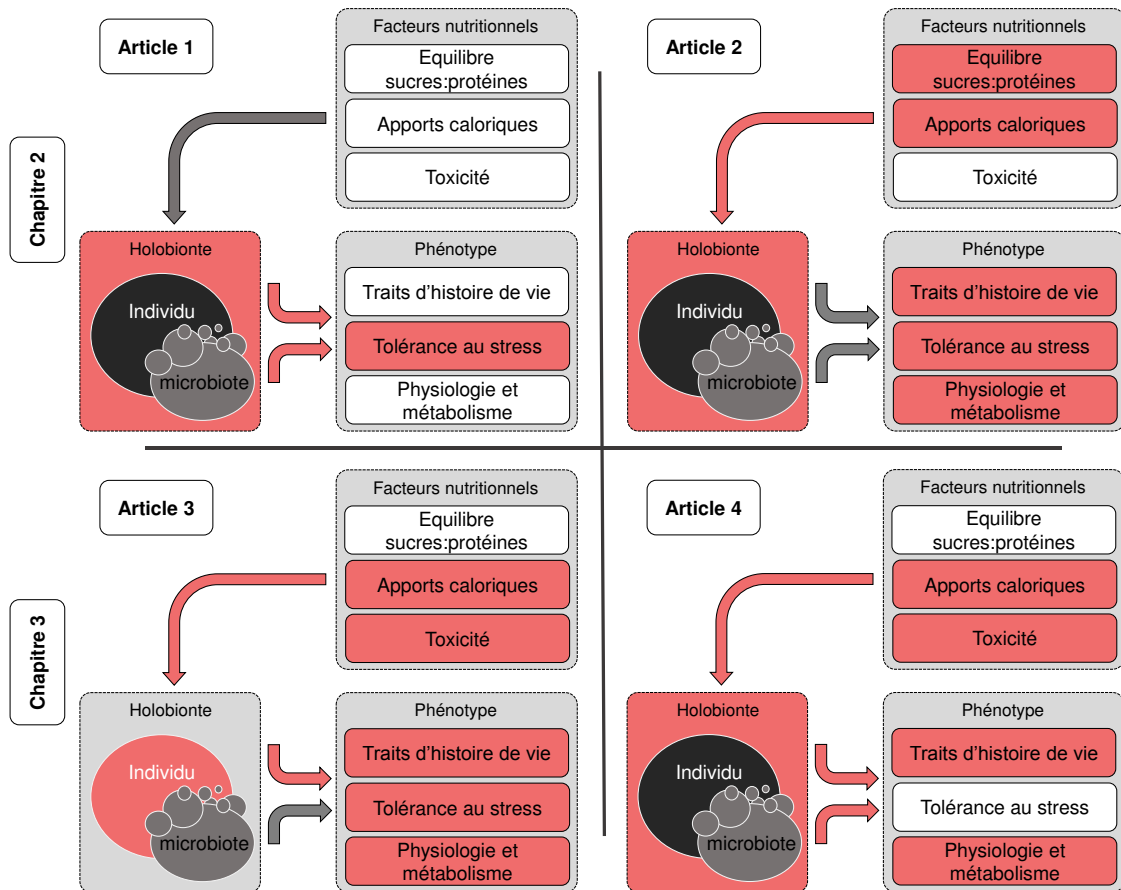


Figure 12 : Structure de la thèse et cadre conceptuel développé à l'intérieur des différents articles composant les chapitres 2 et 3. Les valeurs de gris représentent tous les paramètres, les structures biologiques, et les interactions qui sont étudiés dans cette thèse. La couleur rouge indique les aspects sur lesquels nous nous sommes penchés spécifiquement dans chaque article.

Dans le chapitre 2, nous avons comparé la tolérance aux stress chaud et froid de mouches conventionnelles ou de mouches dont le microbiote était artificiellement retiré. Cela a permis dans un premier temps de déterminer si le microbiote pouvait affecter la tolérance au stress (**article 1**). Ensuite, nous avons cherché à approfondir la question des effets du microbiote en élargissant le panel de stress testés (dessiccation, jeûne), mais également en mesurant les changements sur le

reste de la physiologie et du développement des individus. Dans le même temps, nous avons testé l'importance de la concentration en sucres et en protéines sur tous ces phénotypes, et sur la manière dont ils modulent les effets du microbiote (**article 2**).

Dans le chapitre 3, nous avons tâché de mettre en évidence les conséquences de la surpopulation larvaire sur le stress thermique ainsi que sur le développement et le métabolisme des mouches. Affiner la précision des résultats préexistants dans la littérature passait par l'examen des effets induits par une large gamme de densités, dans le but d'éventuellement saisir les différences de réponse entre stress modéré et stress extrême (**article 3**). La surpopulation est sans aucun doute un stress de restriction alimentaire, mais elle génère également d'autres stress qui sont indirectement causés ou non par cette restriction. Dans ce dernier article, l'objectif était d'explorer les modifications du phénotype des mouches en rapport à ces stress annexes. En premier lieu nous avons mesuré les concentrations en différents composés toxiques issus du métabolisme, à la fois dans les larves et dans leur milieu nutritif. Nous avons ensuite testé les effets développementaux d'une supplémentation artificielle des composés détectés, à densité constante. Enfin, l'altération qualitative du substrat engendrée par la surpopulation est supposée affecter les communautés de microorganismes. Nous avons donc cherché à caractériser les communautés de microorganismes du microbiote intestinal ainsi que celles du substrat nutritif aux différentes conditions de densité larvaire, et nous avons essayé de mettre les patrons observés en perspective avec les changements développementaux des mouches (**article 4**).

Chapitre 2 – Effets physiologiques et phénotypiques du microbiote et de l'interaction nutrition-microbiote

“Our darkest fiction is full of Orwellian dystopias, shadowy cabals, and mind-controlling supervillains. But it turns out that the brainless, microscopic, single-celled organisms that live inside us have been pulling on our strings all along”

Ed Yong (2016) *I Contain Multitudes*



Article 1 - Microbiota disruption leads to reduced cold tolerance in *Drosophila* flies

Microbiota is partly responsible for maintaining metabolic processes, keeping in check the gut epithelium homeostasis, or regulating the growth of its host (Ryu et al., 2008; Storelli et al., 2011; Wong et al., 2014). Knowing all these features are often also involved in the thermal stress response, we hypothesized that microbiota dysbiosis could impair the health of flies, and reduce their ability to survive cold and heat exposures (Broughton et al., 2005; MacMillan et al., 2017; Overgaard et al., 2007). To test this hypothesis, we compared survival of flies with artificially removed microbiota to flies with untouched microbiota.

Main findings:

- 1) Our treatment greatly diminished the abundance of bacteria, without affecting the bacterial diversity.
- 2) Cold tolerance was significantly reduced by the microbiota disruption treatment, but heat tolerance stayed unchanged, whether the individuals were treated or not.
- 3) Chill coma recovery and acute cold stress survival responded in the same way to the treatment, suggesting microbiota disruption altered a physiological feature relevant for both tolerance traits.



Microbiota disruption leads to reduced cold tolerance in *Drosophila* flies

Youn Henry¹ · Hervé Colinet¹

Received: 18 May 2018 / Revised: 3 July 2018 / Accepted: 5 September 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

It is now acknowledged that bacteria from gut microbiota deeply interact with their host by altering many physiological traits. Such interplay is likely to consequently affect stress tolerance. Here, we compared cold and heat tolerance of *Drosophila melanogaster* flies with undisrupted (control (*Co*)) versus disrupted gut microbiota (dechorionated eggs (*De*)). The disrupting treatment strongly reduced bacterial load in flies' guts, though 16S sequencing analysis did not evidence strong diversity changes in the remaining bacterial community. Both chill coma recovery and acute cold survival were repeatedly lower in *De* than in *Co* flies under our experimental conditions. However, heat tolerance was not consistently affected by gut disruption. Our results suggest that microbiota-related effects on the host can alter ecologically relevant traits such as thermal tolerance.

Keywords Gut microbiota · Fruit flies · Thermal stress · Chill coma

Introduction

Over the last two decades, studies have linked variation in microbiota composition to variation in numerous host characteristics, including immune response, metabolism, morphology, fitness, and development (Brummel et al. 2004; Ryu et al. 2008; Shin et al. 2011; Wong et al. 2014). Most of these microbiota-mediated changes are caused by the production of primary or secondary metabolites or by the presence of bacteria per se (Matos et al. 2017). All these molecular signals can up- or downregulate multiple cellular pathways of the host and alter its whole physiology. Despite their functional importance, commensal gut bacteria communities vary considerably with time and environmental parameters (Engel and Moran 2013; Wong et al. 2013). For instance, in *Drosophila melanogaster*, bacterial load and diversity are strongly altered

by nutrition (Staubach et al. 2013) or aging (Clark et al. 2015). Impoverished microbiota may lead to dysbiosis and reduce benefits provided by microorganisms (e.g., amino acids, vitamins, and other metabolites) (Ridley et al. 2012; Yamada et al. 2015). Thus, microbiota appears as a highly labile component of the holobiont, which could be the source of ecologically relevant phenotypic variations that are not under the control of the host's genome.

Given the range of beneficial functions provided by microbiota, it may also shape the ability of hosts to tolerate stressful situations (Soen 2014). In particular, coping with temperature variations is critically important for ectotherms. Alteration of energy reserves, metabolism, or gene expression by microbiota may indirectly affect thermal tolerance, which strongly depends on these traits (Teets and Denlinger 2013). In humans, the presence of gut bacteria such as *Lactobacillus* sp. is correlated with the production of heat shock proteins, a family of chaperone molecules able to repair cellular damages generated by thermal stress (Liu et al. 2014). In insects, some studies investigated microbiota effects on thermotolerance. For instance, intracellular heritable symbionts such as *Hamiltonella* and *Serratia* can promote the fitness of their thermally stressed aphid hosts (Russell and Moran 2006). Recent data suggest developmental temperature strongly affects microbial composition of *D. melanogaster* (Moghadam et al. 2017). However, whether gut microbiota have a role to play in thermotolerance remains unclear.

Communicated by Volker Loeschcke

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00114-018-1584-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Hervé Colinet
herve.colinet@univ-rennes1.fr

¹ UMR CNRS 6553 Ecobio, Université de Rennes1, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042, F-35000 Rennes, France

Here, we hypothesized that *D. melanogaster* harboring a disrupted gut microbiota would be more susceptible to stressful temperatures (cold and heat), compared to flies with intact microbiota. To test this assumption, we disrupted flies' microbiota, evaluated the outcome of this treatment with colony counting and 16S sequencing methods, and then assessed thermotolerance using replicated experiments.

Material and methods

Fly culture

We conducted the experiments on an outbred *D. melanogaster* population derived from wild individuals collected in 2015 in Brittany (France). This lineage did contain *Wolbachia* symbionts. We routinely maintained fly stocks at 25 °C (12L:12D), on standard yeast-sugar-agar fly medium (16% yeast, 5% sugar, 8 mL L⁻¹ Nipagin). Before experiments, one generation was reared on decaying organic fruits to maximize bacterial diversity.

Generation of dysbiotic flies

We performed the experiments over two independent replicates. Adults were collected and allowed to lay eggs for 6–12 h on agar plates. Eggs were collected with a paint brush and transferred to one of the two following treatments for development:

Dechoriation (*De*): eggs were successively immersed in 2.7% hypochlorite for 2 min, 70% ethanol for 2 min, and rinsed twice in autoclaved water (Koyle et al. 2016). Dechorionated eggs were then aseptically transferred into autoclaved food vials under a sterile laminar flow ($N=30$, approx. 50 eggs per vial). At emergence and every other day thereafter, adults were transferred to new autoclaved food vials.

Control (*Co*): eggs were transferred after water wash in vials ($N=30$, approx. 50 eggs per vial) containing autoclaved food recontaminated with 50 μ L of homogenized flies. Recontamination was assumed to guarantee bacterial colonization of autoclaved sterile food. Emerging adults were then maintained as above.

In all experiments, we used 4–6-day-old females that were visually sexed without CO₂ to avoid stress (Colinet and Renault 2012). Additional details on the experimental protocol are presented in **ESM** and Fig. S1.

Thermal tolerance

For chill coma recovery (CCR), we exposed 50 females to 0 °C for 12 h in an incubator (MIR-154, Sanyo, Japan), and time to recover at 25 °C was individually monitored. For acute

cold stress, flies placed in glass vials were immersed into a water-glycol bath set at -3.5 ± 0.1 °C for cold stress and 38.5 ± 0.1 °C for heat stress. Exposure lasted for maximum 120 min, and every 15 min starting from $t=0$ min, 20–30 individuals were removed from the bath, resulting in nine exposure durations. We scored survival after 24 h at 25 °C.

Microbiota quantification and sequencing

We used plating to evaluate bacterial load in flies, following a standard protocol (Koyle et al. 2016).

We performed Illumina MiSeq sequencing of microbiota in three randomly picked biological replicates of *De* and *Co* flies, from whole body DNA extracts. Individuals were surface-sterilized with hypochlorite and ethanol to avoid the extraction of external bacteria. Sequencing was only performed in the second replicated experiment.

Complete experimental procedures are described in **ESM**.

Statistical analyses

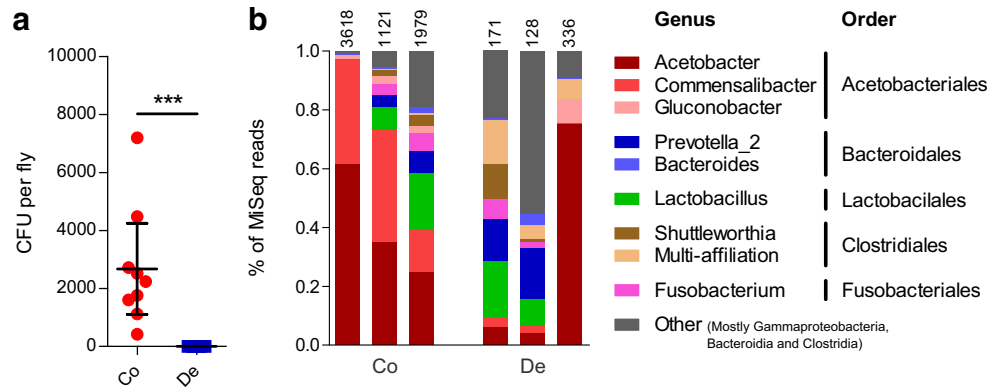
CCR were analyzed with log-rank method using Prism software (Graphpad, La Jolla, USA). Other analyses were performed using R (R Core Team 2017). Binomial generalized linear models (GLMs) with a logit link function followed by Tukey tests were used for acute stress survival. Differences in bacterial load were tested with *t* tests. Clustering OTU at genus level and computation of *alpha* and *beta* diversity was performed using “phyloseq” package (McMurdie and Holmes 2013).

Data availability The datasets generated during the current study are available in the Figshare repository https://figshare.com/projects/Data_accessibility_Microbiota_disruption_leads_to_reduced_cold_tolerance_in_Drosophila_flies_/28995.

Results

Plating of flies' gut bacteria confirmed an effective bacterial load reduction by dechoriation treatment ($t=4.15$, $df=17$, $p<0.001$; Fig. 1a). MiSeq sequencing generated 39,000 to 50,000 reads per sample. After removal of *Wolbachia* reads, *De* flies still presented reads corresponding to common OTU in fruit flies. The number of reads in these *De* flies was however drastically reduced (Fig. 1b), suggesting again a quantitative reduction of gut bacteria by the treatment. Bacterial community information obtained by 16S sequencing revealed a large dominance of *Acetobacteraceae* order in *Co* flies, which was less clear in *De* flies (Fig. 1b). We found a low representation of *Commensalibacter* in *De* flies, while this genus was largely represented in *Co*. Yet, we could not detect

Fig. 1 Microbiota characteristics of flies from the second replicate. **a** Colony forming unit (CFU) per fly in *Co* and *De* individuals. **b** Stacked relative abundance of bacteria from flies' gut represented at the genus level. The number of reads effectively used for each replicate is displayed on top of bars



any significant microbiota structure or diversity alteration caused by the treatment (*Co* vs. *De*: Shannon alpha diversity comparison, $F = 0.25$, $df = 1$, $p = 0.643$; Bray-Curtis beta diversity comparison, $F = 3.08$, $df = 1$, $p = 0.1$).

Cold tolerance was significantly lower in *De* compared to *Co* flies. CCR was longer in *De* than in *Co* flies, in both replicated experiments ($\chi^2 = 12.78$, $df = 1$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 14.55$, $df = 1$, $p < 0.001$; in Fig. 2(A, D) respectively). Survival rate after cold exposure was also negatively impacted by dechoriation ($\chi^2 = 28.68$, $df = 1$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 35.71$, $df = 1$, $p < 0.001$; in Fig. 2(B, E) respectively). However, we did not observe a consistent effect of microbiota disruption on acute heat stress survival. The treatment significantly reduced heat tolerance in the first, but not in the second replicate ($\chi^2 = 8.18$, $df = 1$, $p = 0.004$; $\chi^2 = 1.23$, $df = 1$, $p = 0.27$; in Fig. 2(C, F) respectively). Overall, the amplitude of heat tolerance variation between *Co* and *De* was small compared to that observed for cold tolerance assay.

Discussion

Our results support the hypothesis that microbiota disruption can alter the ability to cope with thermal stress. The drastic reduction of bacterial load in dechoriated flies was associated with delayed recovery after mild cold stress and reduced survival to acute cold stress. Heat tolerance, on the other hand, remained almost unaffected. This result is unsurprising given cold tolerance is generally more plastic than heat tolerance (Schou et al. 2017). Although our experimental design did not allow separating effects of microbiota from effects of microbiota elimination treatment, dechoriation is assumed to have limited non-specific effects (Ridley et al. 2013). Consequently, our observations are likely due to actual microbiota disruption.

Mechanisms underlying these stress tolerance divergences can be very diverse. Loss of ion homeostasis across gut epithelia is directly responsible for chill injuries (Overgaard and

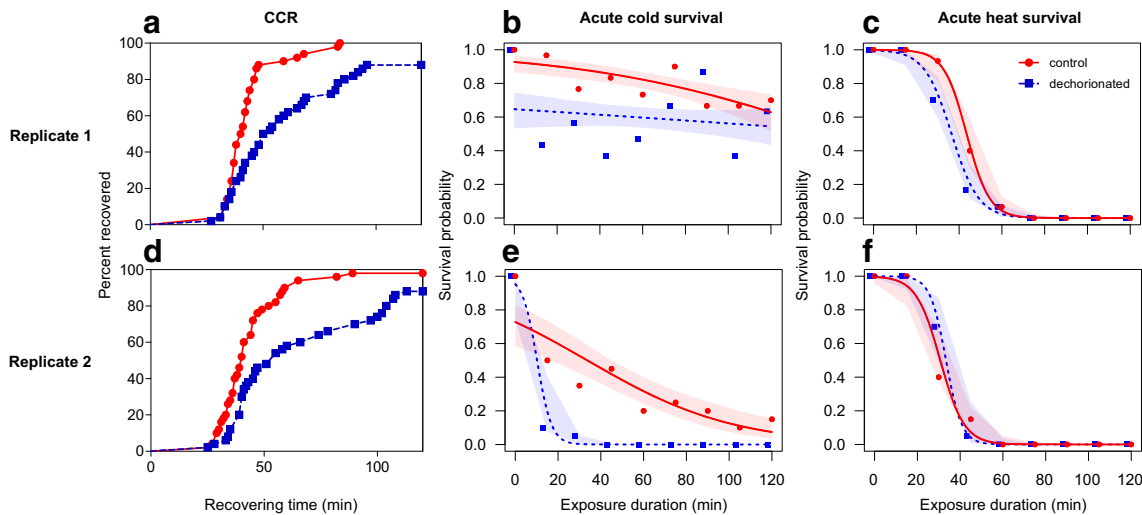


Fig. 2 Cold tolerance of *Co* vs. *De* flies. (A, D) CCR curves of female *Drosophila* flies after 12 h exposure to 0 °C ($N = 50$). (B, E) Survival curves of female *Drosophila* flies 24 h after being exposed to -3.5 °C for increasing durations ($N = 180-270$). (C, F) Survival curves of female *Drosophila* flies 24 h after being exposed to +38.5 °C for increasing

durations ($N = 180-270$). Dots indicate raw survival proportions for 20-30 individuals at a given exposure duration. Lines indicate predicted survival probabilities based on a binomial GLM. Shaded areas indicate 95% confidence intervals around model predictions. Each row of plots represents one independent experiment

MacMillan 2017; MacMillan et al. 2017). Whether gut microbiota affects this process has not been tested, but findings suggest that complex interactions among pH, ion transporters, and bacteria do take place in the midgut (Overend et al. 2016). Nutrition is another critical determinant of cold tolerance (Colinet et al. 2013), but it also constitutes a keystone of microbiota-host relationship (Ridley et al. 2012). Elimination of microbiota was shown to induce modifications of nutrient acquisition, with sometimes pathologic consequences on triglycerides and glycogen reserves (Wong et al. 2014). With these compounds being linked to stress response, cold tolerance is likely to be affected in return. Finally, it has been proposed that yeasts, an often-neglected part of *Drosophila* microbiota, could be a major driver of microbiota-mediated thermotolerance effects (Jiménez Padilla 2016). Dechoriation is not specific to bacteria and also eliminates yeasts, which could explain part of the observed phenotypes in our experiments.

To conclude, we showed here a potential novel role of gut microbiota on thermotolerance. Whether it is under control of a specific mechanism or merely a side effect of global metabolic changes induced by quantitative reduction of commensal microorganisms still needs to be elucidated.

Acknowledgments Authors thank the GeT-PLaGe platform for Miseq sequencing.

Compliance with ethical standards

Competing interests The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S (2004) *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12974–12979. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405207101>
- Clark RI, Salazar A, Yamada R, Fitz-Gibbon S, Morselli M, Alcaraz J, Rana A, Rera M, Pellegrini M, Ja WW, Walker DW (2015) Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality. *Cell Rep* 12:1656–1667. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.004>
- Colinet H, Renault D (2012) Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett* 8:1050–1054. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0601>
- Colinet H, Larvor V, Bical R, Renault D (2013) Dietary sugars affect cold tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Metabolomics* 9:608–622. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0471-z>
- Engel P, Moran NA (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37:699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Jiménez Padilla Y (2016) Effects of gut-associated yeasts on *Drosophila melanogaster* performance. Electron Thesis Diss Repos
- Koyle ML, Veloz M, Judd AM, Wong ACN, Newell PD, Douglas AE, Chaston JM (2016) Rearing the fruit fly *Drosophila melanogaster* under axenic and gnotobiotic conditions. *J Vis Exp* e54219–e54219. <https://doi.org/10.3791/54219>
- Liu H, Dicksved J, Lundh T, Lindberg JE (2014) Heat shock proteins: intestinal gatekeepers that are influenced by dietary components and the gut microbiota. *Pathogens* 3:187–210. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010187>
- MacMillan HA, Yerushalmi GY, Jonusaite S et al (2017) Thermal acclimation mitigates cold-induced paracellular leak from the *Drosophila* gut. *Sci Rep* 7:8807. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08926-7>
- Matos RC, Schwarzer M, Gervais H, Courtin P, Joncour P, Gillet B, Ma D, Bulteau AL, Martino ME, Hughes S, Chapot-Chartier MP, Leulier F (2017) D-Alanylation of teichoic acids contributes to *Lactobacillus plantarum*-mediated *Drosophila* growth during chronic undernutrition. *Nat Microbiol* 2:1635–1647. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0038-x>
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Moghadam NN, Thorshauge PM, Kristensen TN, de Jonge N, Bahrmndorf S, Kjeldal H, Nielsen JL (2017) Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature. *Fly (Austin)* 12:1–12. <https://doi.org/10.1080/19336934.2017.1394558>
- Overend G, Luo Y, Henderson L, Douglas AE, Davies SA, Dow JAT (2016) Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep27242>
- Overgaard J, MacMillan HA (2017) The integrative physiology of insect chill tolerance. *Annu Rev Physiol* 79:187–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034142>
- R Core Team (2017) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Ridley EV, Wong AC-N, Westmiller S, Douglas AE (2012) Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 7:e36765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036765>
- Ridley EV, Wong ACN, Douglas AE (2013) Microbe-dependent and nonspecific effects of procedures to eliminate the resident microbiota from *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol* 79:3209–3214. <https://doi.org/10.1128/AEM.00206-13>
- Russell JA, Moran NA (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 273:603–610. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3348>
- Ryu J-H, Kim S-H, Lee H-Y, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ (2008) Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 319:777–782. <https://doi.org/10.1126/science.1149357>
- Schou MF, Mouridsen MB, Sørensen JG, Loeschcke V (2017) Linear reaction norms of thermal limits in *Drosophila*: predictable plasticity in cold but not in heat tolerance. *Funct Ecol* 31:934–945. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12782>
- Shin SC, Kim S-H, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ (2011) *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* 334:670–674. <https://doi.org/10.1126/science.1212782>
- Soen Y (2014) Environmental disruption of host–microbe co-adaptation as a potential driving force in evolution. *Front Genet* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00168>
- Staubach F, Baines JF, Künzel S, Bik EM, Petrov DA (2013) Host species and environmental effects on bacterial communities associated with *Drosophila* in the laboratory and in the natural environment. *PLoS One* 8:e70749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070749>
- Teets NM, Denlinger DL (2013) Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol Entomol* 38:105–116. <https://doi.org/10.1111/phen.12019>

- Wong AC-N, Chaston JM, Douglas AE (2013) The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *ISME J* 7:1922–1932. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.86>
- Wong AC-N, Dobson AJ, Douglas AE (2014) Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *J Exp Biol* 217:1894–1901. <https://doi.org/10.1242/jeb.101725>
- Yamada R, Deshpande SA, Bruce KD, Mak EM, Ja WW (2015) Microbes promote amino acid harvest to rescue undernutrition in *Drosophila*. *Cell Rep* 10:865–872. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.018>

Supplementary material

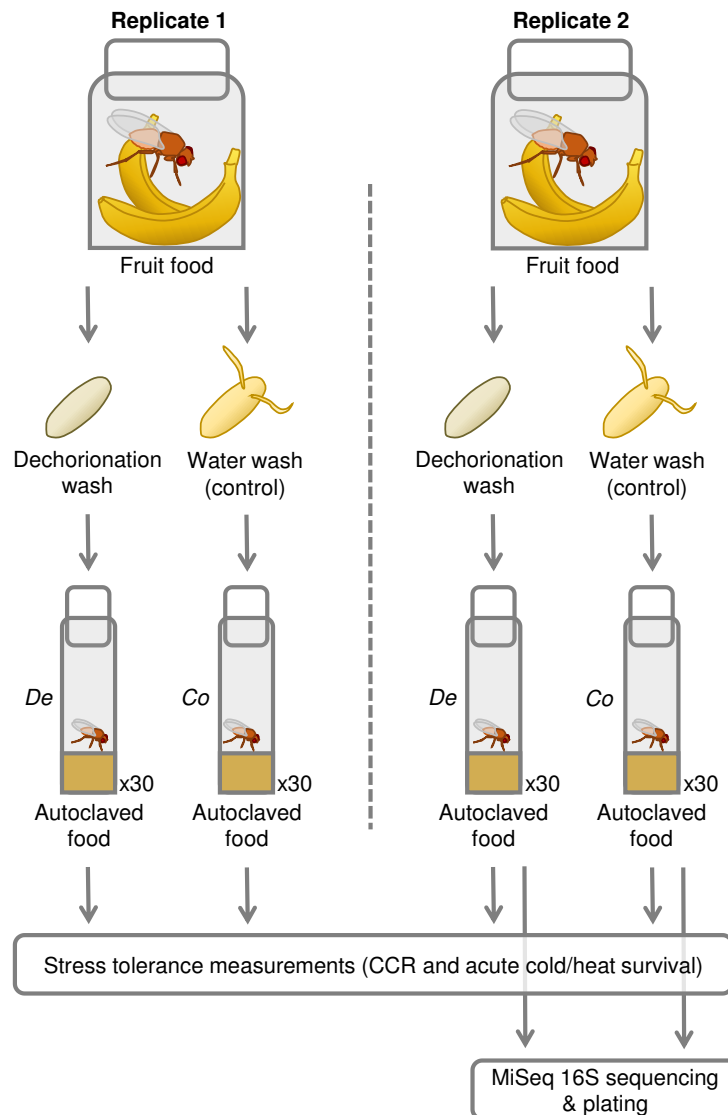


Figure S1: Experimental procedure for stress measurements and microbiota characterization in replicates 1 and 2.

Detailed methods

Generation of dechlorinated and control flies

We performed the experiments over two independent replicates. Parental cohort of stock flies was reared on decaying organic fruits (mix of banana, apple and pear) in order to maximize bacterial diversity before the experiment. Three days old flies were allowed to lay eggs for 6-12h on agar plates. Eggs were collected with a paint brush, and transferred to one of the two following treatments for development:

(i) Dechoriation (*De*): we successively immersed eggs in 2.7% hypochlorite for two minutes, 70% ethanol for two minutes, and rinsed them twice in autoclaved water (Sabat et al. 2015; Koyle et al. 2016). Dechoriated eggs were then aseptically transferred into autoclaved food vials under a sterile laminar flow (N=30, approx. 50 eggs per vial). At emergence and every other day thereafter, adults were transferred to new autoclaved food vials.

(ii) Control (*Co*): after a simple water wash, we transferred eggs in vials (N=30, approx. 50 eggs per vial) containing autoclaved food recontaminated with 50 μ L of homogenized flies solution. This solution consisted in 50 females from stocks homogenized in 1000 μ L of MiliQ water. At emergence and every other day thereafter, adults were transferred to new autoclaved food vials.

We visually sexed females (4-6 days old) right before experiments, without CO₂ to avoid stress (Colinet and Renault 2012). This whole procedure is summarized in Fig. S1.

We chose not to perform a dechoriation step on *Co* eggs in order to control for the dechoriation effect *per se*. A fair compromise to avoid excluding marginal microbiota diversity while still being able to compare treatments, was to use dechoriation only in *De* flies. Whereas antibiotic treatments do show some non-specific effects, dechoriation only generates very minor side-effects unrelated microbiota loss (Ridley et al. 2013).

Autoclaving food was required for *De* flies to guarantee sterility inside the culture tubes. Since autoclaving is significantly disrupting yeasts cell walls, it is also altering nutrient availability in the medium (Bzducha-Wróbel et al. 2014). Consequently, we also autoclaved food of *Co* flies. However, the simple fact of rearing flies on a sterile medium without further treatment is already limiting bacterial colonization (Blum et al. 2013). To avoid this issue while still autoclaving the food, we performed a recontamination of sterile food using the fly homogenate described above.

Microbiota quantification and sequencing

We used plating to evaluate bacterial load in flies from the second replicate, following a standard protocol (Koyle et al. 2016). Five 4 days old females were externally sterilized with 70% ethanol and homogenized in MRS broth (69966, Sigma-Aldrich, USA) using a bead beating apparatus and two tungsten beads (N=10 by treatment). Samples were plated on agar MRS petri dishes at several dilutions and incubated in aerobic conditions at 30°C for 48 h before colony counting.

Sequencing was only performed in the second experimental replicate (fig. S1). To remove external bacteria, we surface-sterilized pools of 10 females (N=3 per treatment) with successive baths of 2.7% hypochlorite for two minutes, 70% ethanol for two minutes, and rinsed them twice in autoclaved miliQ water. DNA extraction was performed using FastDNA spin kit (MP

Biomedicals, Santa-Ana, CA, USA) according to manufacturer's instructions. We used PCRs to amplify V3/V4 16S RNA regions with universal bacterial primers: forward (5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG-3'), and reverse (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3') with adapters for MiSeq (François et al. 2016). Thirty thermal cycles at 65°C annealing temperature were performed. The PCR products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge (Illumina, San-Diego, CA, USA) according to manufacturer's instructions. All pair-end sequences were assembled using Flash software (Magoč and Salzberg 2011) using at least a 10bp-overlap between the forward and reverse sequences, allowing 5% of mismatch. Dereplicating, denoising, clustering and chimera removing steps were sequentially performed using Galaxy tool "FROGS" (Escudié et al. 2016). Reads numbers were normalized to the lower sample (39 000). Taxonomic affiliation was defined using Silva132 16S database. When incoherent affiliations were generated, a blast was performed with NCBI database and the identification was corrected if needed. A filter was applied to remove marginal diversity represented by low number of reads (< 0.05% of total number of reads per sample). Sequences corresponding to *Wolbachia* were excluded (representing > 99% in *De* flies and ≈ 94% in *Co* flies). 'Phyloseq' package was used to cluster OTUs at the genus levels, and compute diversity analyses in R.

References

- Blum, J. E., Fischer, C. N., Miles, J. and Handelsman, J. (2013). Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *MBio* **4**, e00860-00813.
- Bzducha-Wróbel A., Błażej S., Kawarska A., Stasiak-Różańska, L., Gientka, I. and Majewska, E. (2014) Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β-glucan isolation. *Molecules* **19**:20941–20961
- Colinet H., Renault D. (2012) Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett* **8**:1050–1054
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S. and Pascal, G. (2016). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*.
- François, A., Grebert, D., Rhimi, M., Mariadassou, M., Naudon, L., Rabot, S. and Meunier, N. (2016) Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Sci Rep* **6**
- Koyle, M. L., Veloz, M., Judd, A. M., Wong, A. C.-N., Newell, P. D., Douglas, A. E. and Chaston, J. M. (2016b). Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*
- Magoč T., Salzberg S. L. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**:2957–2963

Ridley E. V., Wong A. C. N., Douglas A. E. (2013) Microbe-dependent and nonspecific effects of procedures to eliminate the resident microbiota from *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol* **79**:3209–3214

Sabat, D., Johnson, E. M., Abhinay, A., Jayabalan, R. and Mishra, M. (2015) A protocol to generate germ free *Drosophila* for microbial interaction studies. *Adv Tech Biol Med* **0**:1–6

Article 2 - Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of *Drosophila melanogaster* in interaction with microbiota.

We previously showed microbiota abundance may be important to sustain a good thermal tolerance. One hypothesis to explain this phenomenon is to consider that microbiota disruption is limiting the nutritional benefits the host can usually derive from its association with mutualistic microorganisms (amino acids harvest, B vitamin synthesis...) (Douglas, 2018; Yamada et al., 2015). Consequently, it is expected that microbiota disruption will show reduced effects on a rich diet with no limiting nutrient, but conversely will be very detrimental on a poor diet, especially with low access to proteins (yeasts). To test this, we compared many traits (including life history traits, metabolism, behavior, and stress tolerance) of flies that were reared in five contrasted diets differing by their caloric content and their sugar:yeast ratio, and that were treated or not with microbiota disruption treatment (dechoriation+antibiotics). The main objective of this study was to evidence and distinguish the part of microbiota alone, the part of nutrition alone, and the part of the nutrition-microbiota interaction in controlling the phenotype of the host.

Main findings:

- 1) Antibiotics treatments successfully eliminated bacteria, but seemed to favor yeasts in the gut microbiota.
- 2) Most of the tested traits depended on the nutrition-microbiota interaction, but with an overwhelming effect of nutrition overall.
- 3) Yeast content was the most impactful parameter of the diet, compared to sugar content and global caloric content. Yeast content determined most of the life history traits, metabolism and behavior.
- 4) Microbiota effects were stronger on diets with low yeast content. Interestingly, we did not replicate the lower metabolic rate found by a previous study in axenic flies.
- 5) High sugar content mostly increased lipid reserves, and consequently improved desiccation and starvation tolerance. High sugar content also significantly delayed the development, and this effect was partly compensated by the microbiota in untreated flies.
- 6) Unlike in the article 1, microbiota disruption improved tolerance to cold stress. This may result from the increased yeast load in treated flies.

Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of *Drosophila melanogaster* in interaction with microbiota.

Y. Henry¹, J. Overgaard², H. Colinet^{1*}

¹ECOBIO - UMR 6553, Univ Rennes 1, CNRS, Rennes, France

²Department of Bioscience - Zoophysiology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark.

*Corresponding author: Hervé Colinet, UMR CNRS 6553 Ecobio, Université de Rennes1, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes, France.

Email: herve.colinet@univ-rennes1.fr

Abstract

Differences in macro-nutrients composition of dietary supply (protein, carbohydrates and lipids) may modify the ability of organisms to persist in a given set of environmental parameters. Dietary changes likely affect gut microbiota as well, and few is known about how the nutrition-microbiota interaction may further interfere in host's key functions. In this study, we reared *Drosophila melanogaster* flies on five different diets; three with balanced sugar:yeast ratio, but with increasing caloric content (2:2, 8:8, 16:16, in weight %), and two with imbalanced sugar:yeast ratio, either with low sugar and high yeast content (2:16) or vice-versa (16:2). In each of these diets, we also tested the impact of gut microbiota on various phenotypic traits by comparing flies with and without altered gut microbiota. Flies from these ten treatments, were characterized in terms of development, body mass, food preference, body reserves, metabolic rate and for a range of stress tolerance traits (heat, cold, starvation and desiccation tolerance). Diets, and to a considerable lesser extent microbiota, altered development rate, weight, and cold stress tolerance of adult flies. Other traits such as energy reserves, metabolic rate, food preference, or starvation tolerance were strongly affected by diet but not by presence/absence of microbiota. When detected, the effects of microbiota disruption were often dependent on the food type. Larger effects of microbiota were, for example, observed in yeast-poor diets, suggesting that gut microbial community may help to counterbalance nutritional deficiencies. These results show that changes in dietary factors lead to a global re-organization of fly physiology and development that may also depend on microbiota status, especially in case of yeast restriction.

Keywords: diet; microbiota; developmental plasticity; stress tolerance; metabolic rate

Introduction

Most animals have a preferred dietary target in terms of macronutrient composition and amount (Simpson and Raubenheimer, 2012). The inability to meet this nutritional target represents a great challenge as it will affect the physiology and performance of organisms including reproduction, development, and lifespan (Lee et al., 2008a; Matzkin et al., 2011). In insect species such as *D. melanogaster*, the topic has been widely investigated because of their relatively simple nutritional requirements combined to the ease of diet manipulation. Dietary restriction (DR) is a common nutritional situation, often assumed to positively affect a range of traits such as lifespan (Mair et al., 2003; Pletcher et al., 2002) and stress tolerance (Burger et al., 2007; Vigne et al., 2009), at the cost of a reduced development rate and fecundity (Partridge et al., 2005). Multiple reports suggest these effects are likely caused by diet composition rather than caloric content (Lee et al., 2008a; Mair et al., 2005; Matzkin et al., 2011). It results that the comprehension of food-driven phenotypic plasticity requires more subtle diet manipulations than the usual global dilution of diet, for instance using nutritional geometry (Simpson and Raubenheimer, 2012). Recent advances in nutritional ecology highlighted the preeminent importance of macronutrients balance in shaping insects' life history traits (Mirth and Piper, 2017).

Organisms are likely to have developed adaptive responses to counterbalance nutritional deficiencies, and thereby cope with sub-optimal resource availability. In some cases, these adaptations consist in behavior changes, like in Mormon crickets that can develop cannibalism and start migrating in case of protein or salt shortage (Simpson et al., 2006). In other cases, changes happen at smaller scale, with physiological and cellular adjustments. For instance, several signaling pathways involved in growth are regulated by nutrient sensing (Kapahi et al., 2004; Koyama et al., 2013; Tang et al., 2011). Food shortage may result in energy trade-off that often manifests as reduced or delayed investment in development and reproduction (Edgar, 2006; Koyama et al., 2013). Some studies interpreted this shift from the “reproduction mode” to the “survival mode” as a way to cope with harsh environment by increasing lifespan and promoting resistance to other stress (Kolss et al., 2009; Rion and Kawecki, 2007; Tatar et al., 2003). For instance, dietary restricted young fruit flies were shown to be more tolerant to starvation than their non-restricted counterparts (Burger et al., 2007; Chippindale et al., 1993). In fact, numerous studies showed that physiology and life history traits are constrained by development which is in turn under tight control of nutrition (Carvalho et al., 2012; Kolss et al., 2009; Layalle et al., 2008; Skorupa et al., 2008). Any change in nutritional supply is thus susceptible to have great consequences on ecologically relevant traits for the species. Accordingly, nutritional aspects may be of great importance for whole ecosystems, with broad implications in populations demography, feeding behavior and dispersal (Raubenheimer et al., 2009).

Durable mutualistic interaction with microorganisms provides multiple advantageous nutritional functions to insects, including the degradation and detoxification of indigestible food, and synthesis of essential nutrients (Douglas, 2009). Understanding the complex tripartite interaction among diet, microbiota and host metabolism represents an exciting and novel challenge in the field of nutritional ecology (Jehrke et al., 2018). Gut microbiota roles in nutrition are generally split in two categories: i) indirect effects on regulating pathways and ii) direct action on digestion process and nutrient supply. Multiple reports have evidenced that gut bacteria help their host to cope with chronic nutritional imbalance (Yamada et al., 2015). Some bacterial species like *Lactobacillus plantarum* or *Acetobacter sp* can promote growth through reactivation of insulin pathways and partially compensate for detrimental effects of poor nutrition in *Drosophila* (Matos et al., 2017; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). Commensal bacteria have also been found to influence behavioral decisions by limiting yeast appetite and buffer for specific amino-acid depletion (Leitão-Gonçalves et al., 2017). Furthermore, the gut microbiota can directly contribute to nutrient supply of *D. melanogaster*, and largely affects both lipid and carbohydrate metabolisms (Ridley et al., 2012; Wong et al., 2014). Other roles include improving peptidase activity (Erkosar et al., 2015) or providing secondary metabolites, vitamins, and amino acids (Sannino et al., 2018; Yamada et al., 2015). In these aforementioned studies, the presence of a functional microbiota was repeatedly found to promote host's nutrition and fitness. In fruit flies, benefits are likely to vary according to diet, bacterial species or strains, as well as host genotype (Dobson et al., 2015; Newell and Douglas, 2014; Wong et al., 2014). For instance, in *Drosophila suzukii*, the presence of a functional microbiota was found to be mandatory for survival on specific poor diets, but deleterious for lifespan on balanced diets (Bing et al., 2018). Microbiota, as a beneficial or costly parameter able to modulate host-nutrition relationship, adds another dimension to consider in nutritional ecology studies (Douglas, 2009).

The impact of nutritional variables, such as changes in carbohydrate-protein ratios, has been extensively studied in insects, but many phenotypical and physiological effects remain to explore when also considering microbiota (Chaston et al., 2016; Huang and Douglas, 2015; Ridley et al., 2012; Wong et al., 2014). Here, we tested the effect of dietary restriction on *D. melanogaster* using diets varying along a “caloric axis”. In addition, we tested alterations of sugar:yeast ratios (S:Y) using diets varying along a “composition axis”, in which sugar represent the main carbohydrate supply and yeast the main protein supply. These dietary manipulations were associated or not with gut microbiota disruption which allowed us to disentangle the role microorganisms plays in host-nutrition interaction. To get a comprehensive overview of the effects resulting from both diet and microbiota alterations, flies were characterized using a large array of metrics, spanning from life history to physiological and stress tolerance traits. We first hypothesized that nutrient scarcity (proteins and carbohydrates) would decrease development

rate, body weight, and metabolic rate, but provide larger relative energy reserves and higher stress tolerance. Considering that gut bacterial community may allow nutritional rescue in poor nutritional situations, we also assumed that altered microbiota would amplify phenotypical differences related to the most deficient diets.

Methods

Fly stocks and culture medium

We conducted the experiments on an outbred laboratory population of *Drosophila melanogaster* derived from wild individuals collected in September 2015 in Brittany (France). Fly stocks were maintained at 25°C under a 12:12 L:D photoperiod, on standard fly medium comprising 80 g. L⁻¹ of inactive brewer yeast (MP Biochemicals 0290331205), 50 g. L⁻¹ of sucrose, 10 g. L⁻¹ of agar (Sigma-Aldrich A1296), supplemented with 8 mL. L⁻¹ of 10% methyl 4-hydroxybenzoate (Sigma-Aldrich H5501). *Wolbachia* was previously eliminated from the population by addition of tetracyclin (5 mg. mL⁻¹) into the food for three consecutive generations, and the absence of the symbiont was checked using PCR (data not shown).

Dietary and microbiota manipulations

Five diets comprising different amounts of sugar and yeast were tested. The experimental design was adapted from Zhu et al. (2014) (see fig. 1). The following S:Y ratios were used: 2:2, 8:8, 16:16, 2:16 and 16:2 (amounts expressed in weight %). 2:2, 8:8, and 16:16 represented balanced diets with gradual increase in the caloric content, whereas 2:16 and 16:2 represented isocaloric diets (Min et al., 2007) but with imbalanced compositions (poor in sugar and rich in yeast, and vice-versa). Except for sugar and yeast concentrations, diets were prepared similarly to standard fly medium, and 40 mL of food was poured per 230 mL plastic bottle.

For each tested S:Y ratio, we compared flies with intact microbiota to flies with disrupted microbiota, resulting in a total of 10 treatments (see fig. 1). The five diet treatments with microbiota disruption are indicated with single quotes (S:Y ratios: 2:2', 8:8', 16:16', 2:16' and 16:2'). Microbiota disruption was obtained by egg dechoriation using successive two minutes wash in 2.7% hypochlorite and two minutes in 70% ethanol, followed by three rinses in sterile miliQ water. In addition, dechorionated eggs were placed on food supplemented with an antibiotic cocktail: 50 µg ampicillin (Sigma-Aldrich A9518), 50 µg kanamycin (Sigma-Aldrich K4000), 50 µg tetracyclin (Sigma-Aldrich T7660) and 15 µg erythromycin (Sigma-Aldrich E5389) per liter of fly food (Téfit et al., 2018). For simplicity, we use the term “antibiotic treatment” in the manuscript to refer to this microbiota disruption procedure including dechoriation and antibiotics.

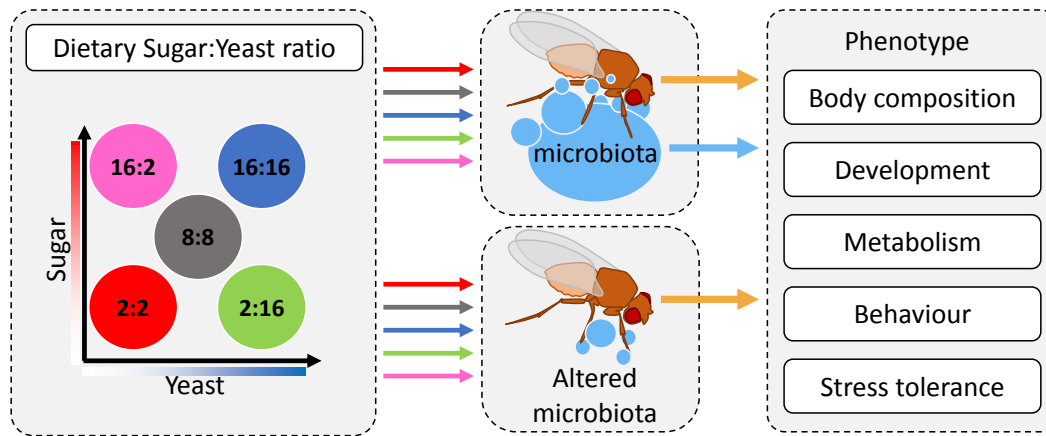


Figure 1: Conceptual framework of the experiment. Dietary composition varies along sugar and yeast content axes, the diagonal being a balanced diet with increasing caloric content. It influences differently fly with conventional (top) or disrupted (bottom) microbiota, leading to variation in diverse phenotypic traits we measured.

Bacterial and yeast load measurement

Colony forming units (CFU) was used to estimate microorganisms load in flies' gut and control the efficiency of the antibiotic treatment with a method adapted from Koyle et al. (2016). Five-days old adult females were randomly picked, snap frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. All manipulations were performed under a sterile laminar flow hood with sterile material, and six replicates per condition were performed. External surface of flies was sterilized by a 2 min wash in 70% ethanol with quick vortexing in 2 mL tubes. Ethanol was discarded and 125 μL of MRS broth (Sigma-Aldrich 69966) and two sterile 5 mm tungsten beads (Qiagen 69989, Qiagen, Hilden, Germany) were added. Tissues were homogenized using a bead beating apparatus set at 25 Hz for 1 min, and then 875 μL of MRS was added to reach 1 mL of final homogenate. The solution was diluted in MRS (three dilution factors: no dilution, 8-fold, 64-fold), and 5 μL of each dilution was plated in Petri dishes on agar-MRS (VWR EM1.10660.0500). Petri dishes were placed at 30°C in an incubator, and colonies were counted after 24 h of incubation. Dilutions with too high number of colonies (>100) were not used; only the lower dilution giving countable colonies was kept for analyses. Identification of species was based on colony morphology and microscope observations.

Mass, water content, and total lipid content measurement

Females (5-d old) from all treatments were snap frozen in liquid nitrogen. Five to seven pools of *ca* 20 flies per treatment were randomly picked and then individually weighted using a microbalance. Samples were dried for 48 h at 60°C and re-weighted to determine their dry mass. Finally, samples were washed repeatedly in boiling petroleum ether for 72 h in order to remove all lipids, and re-dried to determine lean mass.

Glucose and glycogen assays

Method for glucose and glycogen content measurements was adapted from Tenessen et al. (Tenessen et al., 2014). Six replicates, each consisting of pools of five 5-d old females were used. Flies were snap frozen in liquid nitrogen, dried at 60 °C for 48 h, and weighted using a microbalance. Samples were kept on ice between all subsequent steps. Flies were crushed in 2 mL eppendorfs with 500 µL of PBS using a bead biting apparatus (TissueLyzer LT, Qiagen, Hilden, Germany) (a single 5 mm tungsten bead per tube, 4 min, 50 Hz). Enzymes in samples were heat-inactivated by a 10 min incubation at 70 °C. Thirty microliters of these samples were dispensed in duplicates in a 96-well plate. In the first well of each duplicate, 100 µL of GO reagent (Sigma Aldrich GAGO-20) were added, and in the second well, 100 µL of GO reagent plus 0.1% amyloglucosidase (Sigma Aldrich 1602) were added. After 60 min incubation at 37 °C, 100 µL of 12 N sulfuric acid was dispensed in all wells to stop the reaction. Absorbance was measured at 540 nm. Glycogen concentration for each sample was determined by subtracting samples without aminoglucosidase (corresponding to glucose concentration) from samples with aminoglucosidase (corresponding to glucose plus glycogen concentration). Quantification was based on a glucose and a glycogen standard curves.

Development time

Adult flies were allowed to lay eggs on standard medium for 8 h before being discarded. Eggs were then collected using a paint brush, treated with the dechoriation treatment or left untouched. Eggs were then placed on the surface of the food, in controlled density of 25 eggs per 40 mL vial filled with 5 mL of medium (N = 4 vials per treatment). The end of the oviposition period was considered as the $t = 0$ for the development of flies. Pupation and emergence events were checked and recorded twice a day.

Metabolic rate assay

Metabolic rate of the flies was indirectly estimated by the rate of CO₂ production ($\dot{V}CO_2$) and O₂ consumption ($\dot{V}O_2$) (Glazier, 2005) using repeated measurements of stop-flow respirometry (Lighton and Halsey, 2011). Here we used an experimental setup similar to that described by Jensen et al. (Jensen et al., 2014). Briefly, 4-d old females from the different treatments were randomly assigned to one of 16 cylindrical glass chambers (dimensions: D: 20 mm L: 70 mm, 11-21 individuals in each chamber). Within each chamber, flies had access to a piece of filter paper (15 mm × 15 mm) with a droplet of the appropriate food to avoid starvation and desiccation. Chambers without flies, with or without filter paper and the droplet of food were also tested to correct measurements from background fluctuations. Two parallel 8-channels-multiplexers (RM Gas Flow Multiplexer, Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) controlled the sequentially flushing and closing of the chambers such that the stop-flow respirometry system enabled us to obtain repeated measures of $\dot{V}CO_2$ and $\dot{V}O_2$ over 24 h. During the flush phase the metabolic chambers

were perfused with CO₂ striped air at a rate of 150 mL min⁻¹ and after the flush phase the chamber was closed while the remaining 15 chambers were flushed. During this period, CO₂ would increase and O₂ decrease and these changes would be measured during the next flush phase (see Jensen et al., 2014 for details). The air leaving the chambers passed a calcium chloride column (AppliChem, Darmstadt, Germany) to remove water before entering a CO₂ analyzer (Li-6251 CO₂ Analyzer, Li-COR Environmental, Lincoln, NE, USA) and an oxygen analyzer (Oxzilla dual absolute/differential oxygen analyzer, Sable Systems, Las Vegas, Nevada, USA).

Data were sampled at 1-s intervals using an UI-2 interface (UI-2 Data Acquisition Interface, Sable Systems) and collected using ExpeData software (ExpeData-UI2 software, Sable Systems). Measurements were performed independently at two experimental temperatures by placing the metabolic chambers in a climate chamber maintained at 15 °C or 25 °C (12:12 L:D). The low temperature did ensure measurements at which locomotor activity is much reduced, allowing to infer the basal levels of gas exchange.

At the end of the experiment, flies were collected, killed by placing them briefly at -20°C after which they were weighted using a microbalance (Sartorius Laboratory Balance type 1712, Göttingen, Germany). Analysis of respiratory data and estimation of basal metabolic rate were performed as in Jensen et al. (2014). Respiratory Quotient (RQ) was calculated from the ratio $\dot{V}CO_2$ to $\dot{V}O_2$. RQ close to 1 represent carbohydrates-based metabolism whereas lower value indicates a more lipid-based or protein based metabolism (Messamah et al., 2017; Péronnet and Massicotte, 1991).

CAFE assay

Adult flies from all treatment combinations were sexed under light CO₂ anesthesia as described above and 5-7d females were used to measure feeding rates using a method adapted from (Ja et al., 2007). Flies were left in empty vials for one hour before starting the experiments. Next, seven females were placed in 40 mL vials with access to food via 2*2 10 µL glass capillaries, containing either 8% sucrose or 8% autoclaved yeast solutions. These foods were supplemented with food coloring as this improved our ability to measure the food intake (N = 5-8 vials per treatment). Vials were placed in a hermetic tank with humidified towels to limit evaporation (25°C, 12:12 L:D). Eight vials with capillaries but without flies were used to control for evaporation. Food consumption was measured using an electronic caliper from the reduction in “liquid height” in the capillaries after 10 h.

Thermal stress assays

Adult flies from all the diets*microbiota combinations were sexed under light CO₂ anesthesia (< 2 min), allowed to recover at least 48 h, and 5-7 d females were used to assess thermal stress tolerance.

For acute stress survival, 180 flies per treatment were divided in nine groups of 20 flies placed into 50 mL vials and immersed in a thermoregulated bath filled with a glycol-water mix set at -3.5°C or 38.5°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) for cold and heat stress respectively. From $t = 0$ to $t = 120$ min, 20 individuals per treatment were removed from the bath each 15 min and transferred into fresh vials with standard food medium to recover at 25°C. Survival was scored 40 h after the stress. Individuals were considered alive when able to stand on their legs.

For critical minimal and maximal temperatures (CT_{min} and CT_{max}), 25 females per treatment were individually placed in 5-mL glass vials immersed in a thermoregulated glycol-water bath set at 20 °C. Next, flies were exposed to a slow ramping down or up at the rate of $\pm 0.1^\circ\text{C min}^{-1}$ and the temperature at which all movement ceased was recorded as the upper or lower thermal limit for a given individual.

Starvation and desiccation assays

Adult flies from all the diets*microbiota combinations were sexed under light CO₂ anesthesia, allowed to recover at least 48 h, and 5-7 d females were used to measure starvation tolerance. Twenty-five females were individually placed in 40 mL vials filled with 5 mL of 1,5% agar-water medium to avoid desiccation (25°C, 12:12 L:D). Survival was checked each two hours for the first 48 h, and each four hours afterwards until 100% mortality was reached. Individuals were considered alive when able to stand on their legs.

For desiccation, 25 females per treatment were individually placed in 5-mL glass vials closed with fine mesh to allow air circulation. These vials were then placed in a hermetic glass tank with a four-centimeter layer of silica-gel that ensured a low air humidity (< 5% RH, 25°C, 12:12 L:D). Survival of flies was checked each hour for 24 h. The time at which all movement ceased was recorded as survival time.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R (R Core Team, 2017). CFU counting was analyzed using negative binomial regression accounting for replicates random effect. Survival was analyzed using cox models for tolerance to starvation and desiccation, that were both measured over time with repeated observations. Pairwise differences were assessed using log-rank Mantel-Cox test with Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons. Acute stress tolerance (cold and heat) were not measured with repeated observations and were thus analyzed using binomial GLM with logit link function (binomial survival~diet*microbiota*exposure duration)

followed by Tukey HSD post-hoc test. ANOVA were used for all other metrics, (metric~diet*microbiota), followed by Tukey HSD post-hoc test. The part of the variance attributed to diet, microbiota, and their interaction was extracted using 'relaimpo' package (Groemping, 2006). For all tests, significance threshold was fixed at $p < 0.01$.

Results

Bacterial and yeast load

The antibiotic treatment used in the present study almost completely killed the microbial community in the treated flies (fig. 2A). The bacterial load was already rather low in conventional flies from several diets, especially those with low yeast supply (2:2 and 16:2). Yeast colonization was also much dependent on diet and microbiota disruption (fig. 2B; table 1). While bacterial load was markedly reduced by microbiota disruption, yeasts were more abundant in microbiota-disrupted flies. Some yeasts colonies were observed in conventional flies, but only in yeast-rich diets (16:16 and 2:16) (fig. 2B).

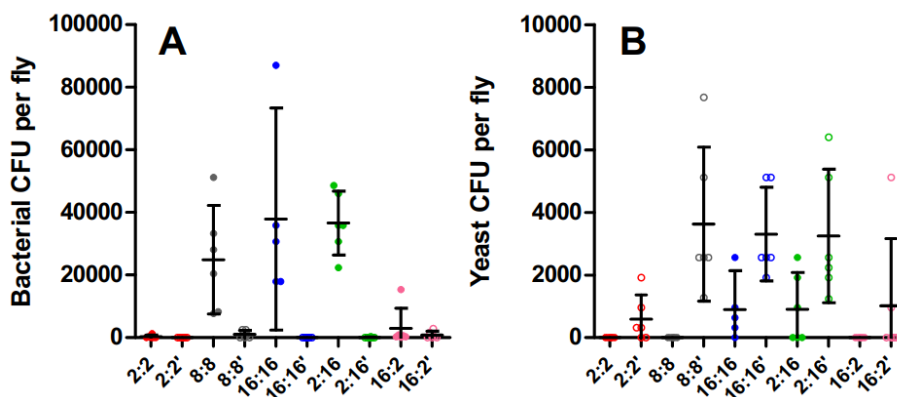


Figure 2: Bacterial and yeast load of adult female flies from the five dietary conditions, with or without antibiotic treatment. Colors represent the different diets. Dots represent replicated CFU countings (N=6 per condition). Filled dots are for individuals with unmanipulated microbiota, and open dots for individuals with antibiotic treatment. Horizontal black lines are means, and error bars are 95% confidence intervals around the mean.

Table 1: General table of effects of diet, microbiota, and diet*microbiota, for all measured metrics.

	Diet			Microbiota			Diet*microbiota			
	Chi statistic (df=4)	p value	Variance explained	Chi statistic (df=1)	p value	Variance explained	Chi statistic (df=4)	p value	Variance explained	Variance explained by the model (%)
Bacterial CFU	90.31	p<0.001	0.32	116.96	p<0.001	0.42	70.98	p<0.001	0.26	-
Yeast CFU	60.73	p<0.001	0.46	57.07	p<0.001	0.43	14.07	p=0.007	0.11	-
Fresh mass	330.17	p<0.001	0.95	0.13	p=0.716	<0.01	17.36	p=0.002	0.05	86.34
Water content	291.27	p<0.001	0.97	2.72	p=0.099	0.01	4.57	p=0.333	0.02	84.52
Total lipid	908.72	p<0.001	0.99	0.21	p=0.649	<0.01	4.23	p=0.374	<0.01	94.32
Glucose content	861.86	p<0.001	0.92	0.01	p=0.913	<0.01	70.57	p<0.001	0.07	94.91
Glycogen content	146.99	p<0.001	0.86	1.57	p=0.210	<0.01	21.4	p<0.001	0.12	77.27
Development rate	3901.09	p<0.001	0.82	378.67	p<0.001	0.08	446.12	p<0.001	0.09	86.61
Dioxygen consumption	572.49	p<0.001	0.98	0.32	p=0.571	<0.01	11.63	p=0.020	0.02	91.4
RQ	90.36	p<0.001	0.95	0.73	p=0.391	<0.01	3.89	p=0.421	0.04	63.24
Food preference	177.93	p<0.001	0.94	3.18	p=0.074	0.01	7.97	p=0.092	0.04	74.03
Food consumption	58.71	p<0.001	0.88	0.16	p=0.689	<0.01	7.56	p=0.109	0.11	50.16
Cold stress survival	555.21	p<0.001	0.96	17.11	p<0.001	0.03	6.53	p=0.163	0.01	82.46
Cold knockdown temperature	28.45	p<0.001	0.11	149.54	p<0.001	0.59	73.18	p<0.001	0.29	51.31
Heat stress survival	28.13	p=0.032	0.73	0.02	p=0.898	<0.01	10.27	p=0.036	0.27	96.85
Heat knockdown temperature	10.85	p=0.028	0.3	16.85	p=0.049	0.47	7.93	p=0.094	0.22	12.93
Starvation tolerance	262.22	p<0.001	0.86	19.36	p<0.001	0.06	21.81	p<0.001	0.07	-
Dessiccation tolerance	29.69	p<0.001	0.78	1.56	p=0.210	0.04	6.8	p=0.146	0.18	-

Body composition

Fresh mass was highly affected by dietary treatments such that yeast-poor diets (2:2 and 16:2) were significantly smaller (by about 40%) in comparison with yeast-rich diets (fig. 3A; table 1). Balanced diets 8:8 and 16:16 did not show significant mass differences linked to caloric content (table S1). Even if the main effect of microbiota and the diet*microbiota interaction were significant, they only accounted for a small part of the mass total variance (table 1), and pairwise differences could not detect clear pattern linked to these two variables (table S1). Water content relative to mass was increased in sugar-poor diets (2:2 and 2:16) in comparison with others diets, but no significant effect of microbiota was observed (fig. 3B; table 1). Similarly, total lipid content was linked to the dietary sugar content and not to microbiota status (fig. 3C; table 1). Thus, flies from sugar-poor diets (2:2 and 2:16) had half the lipid content of flies from the others diets (fig. 3C; table S1). Carbohydrate reserves (glucose and glycogen) were highly influenced by diet (fig. 3D & E; table 1). Flies that developed on diets with low yeast content (2:2 and 2:16) were characterized by high levels of glucose and glycogen compared to other treatments (table S1). Sugar-rich diets did not result in carbohydrate rich flies when the S:Y ratio was balanced (8:8 and 16:16). Diet*microbiota interactions were significant for both glucose and glycogen contents, accounting for about 10% of the total variance. This manifested in higher levels of carbohydrates in 2:2' compared to 2:2, but lower glucose level in 16:2' compared to 16:2 (fig. 3D & E; table S1).

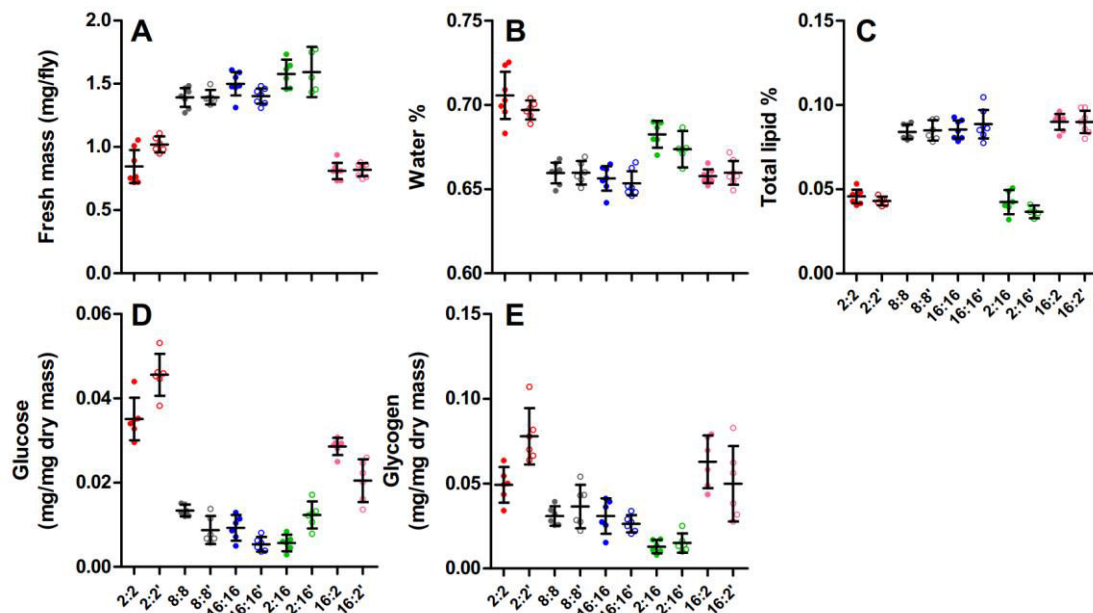


Figure 3: Weight and body composition of adult female flies from the five dietary conditions, with or without antibiotic treatment. Colors represent the different diets. Filled dots represent measurements for individuals with unmanipulated microbiota, and open dots measurements for individuals with antibiotic treatment. In A, B and C, dots represent means for 14-21 individuals (N=7 per condition); in D and E, dots represent pools of 5 individuals (N=6 per condition). Horizontal black lines are means, and error bars are 95% confidence intervals around the mean.

Development, metabolism and nutritional behavior

Development time (fig. 4A) was significantly impaired by diet and diet*microbiota interaction (table 1). Diets with low yeast content (2:2 and especially 16:2) increased development time compared to the other treatments (pairwise comparisons in table S1). Antibiotic treatment also tended to delay development (fig. 4A) but here the effect was diet-specific with considerable delay of development in the sugar rich 16:2' diet but only minor delay in the others (fig. 4A; table S1). Metabolic rate, measured as oxygen consumption, was high in yeast-rich diets (8:8; 16:16; 2:16), and low in yeast-poor ones (fig. 4B; table S1). Caloric content of the diets seemed to have limited effect on oxygen consumption since the highly caloric but yeast-poor diet (16:2) showed a rather low oxygen consumption, not different from the 2:2 diet (table S1). There were no significant effects of microbiota on metabolic rate either (table 1). As expected, balanced diets (2:2; 8:8; 16:16) were characterized by an intermediate RQ (0.9-0.94), sugar-rich diets (16:2) had a RQ very close to 1 and yeast-based diets (2:16) had a RQ of 0.8-0.85 (fig. 4C; table S1). No pairwise differences could be evidenced between the RQ of flies from diets with and without antibiotics (table 1). Food preference varied between diets in a pattern that indicated compensation for lacking nutrient related to the rearing diet (fig. 4D; table 1). Thus, sugar consumption was lower than yeast consumption in all diets except in the flies reared on yeast-rich diet (2:16). Conversely, flies from yeast-poor diets (2:2 and 16:2) were those most attracted by yeast (fig. 4D; table S1). Total food consumption also showed compensatory feeding as flies reared on reduced caloric content (2:2) fed more than all other dietary groups (fig. 4E). Analysis of variance showed that food preference and total food consumption variations mostly resulted from diet composition, with no significant effect of microbiota (table 1).

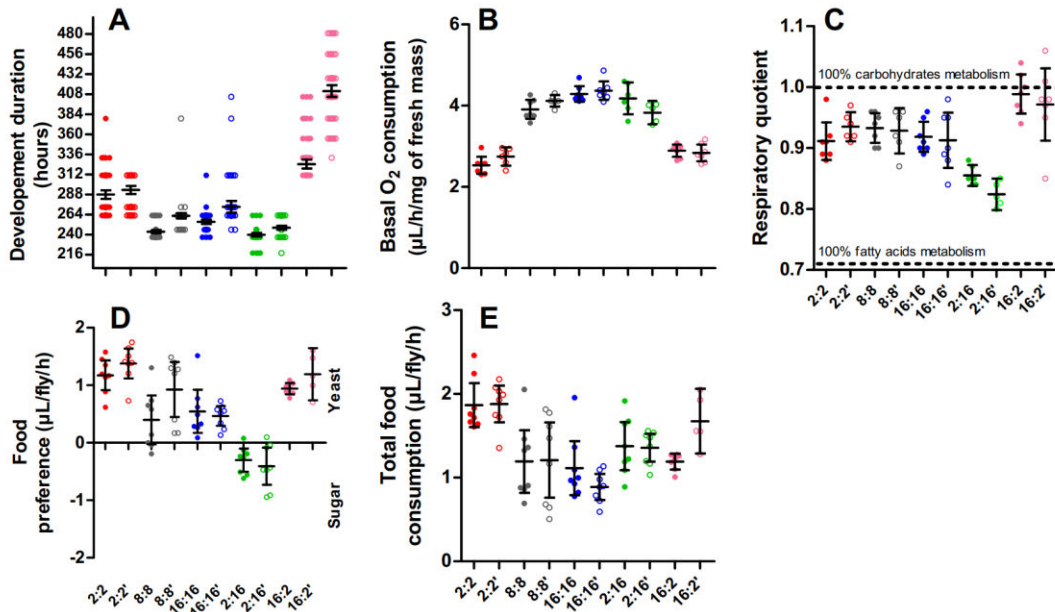


Figure 4: Developmental, metabolic and behavioral characteristics of adult female flies from the five dietary conditions, with or without antibiotic treatment. Colors represent the different diets. Filled dots represent measurements for individuals with unmanipulated microbiota, and open dots measurements for individuals with antibiotic treatment. In A, dots are individual adult emergence events; in B and C, dots represent the mean for 14-21 individuals (N=7 per condition); in D and E, dots are the mean for 7 individuals (N=8 per condition). Food preference index is the subtraction of sugar consumption to yeast consumption in a choice experiment. Total consumption is the addition of sugar and yeast consumption in the same choice experiment. Horizontal black lines are means, and error bars are 95% confidence intervals around the mean.

Stress tolerance

Cold survival was significantly and mainly affected by diets (fig. 5A; table 1). Flies from balanced diets with medium or large caloric content (8:8 and 16:16) were sensitive to cold while flies from yeast-poor ones (2:2 and 16:2) were especially tolerant (fig. 5A; table S1). Significant effect of microbiota was detected on cold survival, as flies from antibiotics diets tended to survive longer exposures than conventional flies, but its impact was weak considering it only represented 3 % of explained variance (table 1). Interestingly, we did not observe that differences in cold survival were reflected in CT_{min} differences (fig. 5B). Although there was a significant effect of diet, it only accounted for a limited part of the explained variance (fig. 5B; table 1). CT_{min} was mainly affected by the microbiota disruption and the diet*microbiota interaction (table 1). Except for the 2:16 diet, flies treated with antibiotics entered chill coma at lower temperatures than flies with intact microbial communities (fig. 5B; table S1). Heat tolerance (acute & knockdown) was not- or at best marginally-affected by diet and microbiota (fig. 5C & D; table 1). Diet, microbiota, and diet*microbiota interaction all affected starvation tolerance (fig. 6A; table 1). Survival to starvation was greatly enhanced in 16:2 flies, reduced in 2:16, and intermediate in all balanced diets (2:2, 8:8, 16:16) (fig. 6A; table S1). The antibiotic treatment globally reduced the starvation tolerance (*e.g.*

16:16 vs 16:16'), although no pairwise differences were found significant (table 1; table S1). For desiccation tolerance we observed a small but significant effect of diet (fig. 6B; table 1). The different dietary groups varied by less than five hours in survival but this was sufficient to separate the most (16:16 and 8:8) from the least resistant flies (2:16) (fig. 6B; table S1).

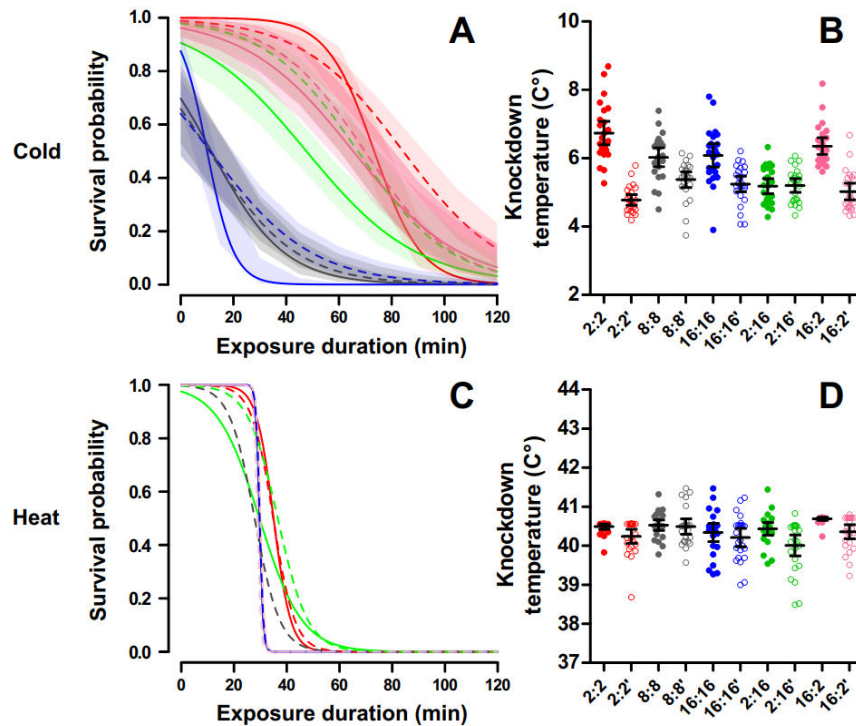


Figure 5: Thermal tolerance characteristics of adult female flies from the five dietary conditions, with or without antibiotic treatment. Colors represent the different diets. Filled dots/plain lines represent measurements for individuals with unmanipulated microbiota, and open dots/dashed lines measurements for individuals with disrupted microbiota. A and B are for cold stress, C and D are for heat stress. In A and C, lines represent survival predictions of non-linear binomial model; in B and D, dots represent individual coma events (N=25). Horizontal black lines in B and D represent the mean. Shades in A and error bars in B and D represent 95% confidence intervals around the mean. No confidence intervals shades are presented in C, as they all overlapped.

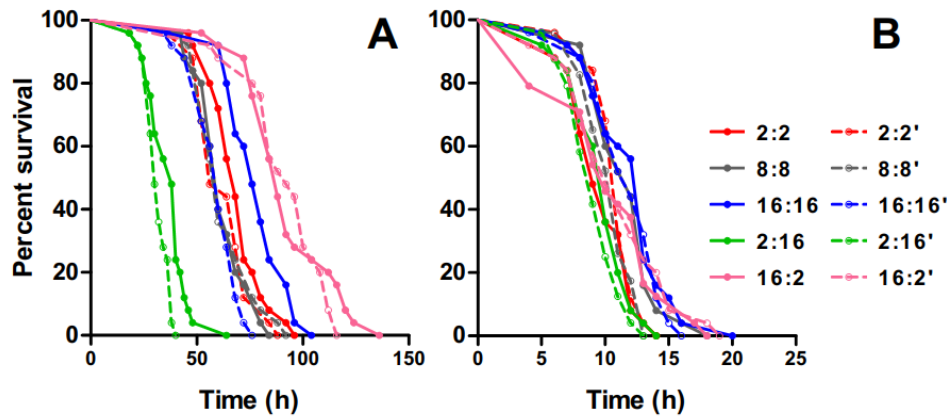


Figure 6: Starvation (A) and desiccation (B) tolerance characteristics of adult female flies from the five dietary conditions, with or without antibiotic treatment. Colors represent the different diets. Plain lines represent individuals with unmanipulated microbiota, and dashed lines individuals with disrupted microbiota. Dots represent survival proportion timepoints of 25 individualized flies.

Discussion

Although dietary effects have been broadly explored in *Drosophila* (Burger et al., 2007; Matzkin et al., 2011; Partridge et al., 2005), it is not yet clear whether phenotypical changes result exclusively from dietary factors *per se* or whether they also entail some indirect influences from gut microbiota. In this study we investigated how both the composition (sugar:yeast ratio) and the caloric content of diets (sugar and yeast concentration) interacted with microbiota elimination. To get a comprehensive overview of the phenotypical effects resulting from these manipulations, flies that developed under such conditions were characterized using a large array of metrics, spanning from body composition, to life history and stress resistance traits.

Dietary effects on nutritional phenotype

The largest part of variation we observed was caused by diets in almost all measured traits. A key result is that caloric content was most of the time irrelevant to explain observed changes, as dietary deprivation or supplementation of one specific nutrient often lead to similar responses than a global caloric deprivation or supplementation. This is coherent with the paradigm change motivated by Mair et al. (2005) and followed by many studies using the geometric framework (*e.g.* Fanson et al., 2009; Lee et al., 2008; Simpson and Raubenheimer, 2012) that nutritional balance is the main limiting nutritional factor. Yeast content generally drove organisms to the extreme phenotypes, irrespective of the sugar content. Yeast-poor diets generated leaner individuals, displaying only half the size of most other developmental groups, and with high glucose and glycogen content. This result is consistent with previous studies in which protein deprivation switched the metabolism to carbohydrates-based reserves (Simmons and Bradley, 1997; Wong et al., 2014). We noticed flies tried to compensate for the yeast scarcity via increased preference for yeast over sugar, and global

increased hunger. The modalities of such compensatory feeding are debated in *Drosophila* (Mair et al., 2005; Min and Tatar, 2006), but our results are in agreement with the current consensus that compensation for protein deprivation is real (Carvalho et al., 2005; Fanson et al., 2012; Leitão-Gonçalves et al., 2017). Despite the compensatory feeding, it appears that flies were unable to meet their target nutrient supply in conditions of yeast restriction. In agreement with previous studies (Matzkin et al., 2011; Wong et al., 2014) we found that nutritional factors had considerable influence on developmental plasticity of the flies. We observed slow development speed correlated to lower oxygen consumption when individuals had limited access to yeast, demonstrating a clear effect of diet on metabolic rate and development (Frazier et al., 2001; Hulbert et al., 2004). It is important to note that our respiration measurements were performed on adults whereas developmental rate was measured on larvae and pupae. Considering previous studies that found no effect of dietary manipulations at the adult stage on flies' metabolic activity (Hulbert et al., 2004), this suggests nutrition may deeply affect physiology of individuals during their early development, and carry over to the adult stage. Metabolic changes likely resulted from the contrasted energy reserves supplied by either yeast-poor or yeast-rich diets. Flies with carbohydrates-based reserves exhibited higher RQ than others, consistently with theory (Harrison et al., 2012).

Sugar content in food also impacted flies' phenotypes, though less obviously than yeast. High amounts of sugar increased total lipid content and decreased water content in flies, as previously observed (Jehrke et al., 2018; Matzkin et al., 2011; Musselman et al., 2011; Wong et al., 2014). In addition, the developmental delay was even longer in yeast-poor and sugar-rich diet (16:2) than in globally poor but balanced diet (2:2), which indicates a detrimental effect of high sugar content. Our data are in accordance with those of Musselman et al. (2011) who reported that high-sucrose feeding resulted in a significant developmental delay (3–5 days). Indeed, excessive dietary sugar tend to suppress protein storage in *Drosophila* (Skorupa et al., 2008). Therefore, it is possible that the high sugar content generated energetic satiety before the protein supply target was met, indirectly reducing the availability of proteins (as yeast) that were already rather limited (Fanson et al., 2012; Lee et al., 2008a).

Microbiota effects on nutritional phenotype

In the light of recent studies pointing out the important role of gut microorganisms in the nutrition of their host (Douglas, 2009; Kau et al., 2011; Matos et al., 2017; Wong et al., 2014), we expected development deficiencies generated by poor diets to be amplified in the absence of functional microbiota. Our treatment combining dechoriation and antibiotics successfully eliminated bacteria from flies' guts. Yet, bacterial platings revealed other interesting information. First, treated flies were unexpectedly colonized by yeasts. This is relevant because validation of antibiotics treatment efficiency is often focused on bacteria (Heys et al., 2018b; Ren et al., 2007), hence missing fluctuations of other members of the microbiota community, including yeasts. Second,

bacterial load was extremely dependent upon the amount of yeast in the food, which could lead to marked phenotypic divergences (Keebaugh et al., 2018). As a result, it is not surprising that we observed a large diet-dependency of microbiota influence, instead of a global “microbiota effect” independently of the diet.

We did not measure tangible effect of microbiota on body size, as described in some studies (Shin et al., 2011). However, our data are in line with findings from Wong et al. (2014b) who only observed a slight increase of mass in axenic flies from poor diet (our 2:2') and slight decrease when they were reared on rich diet (our 16:16'). Although effect of microbiota on lipids storage is not a general rule (Ridley et al., 2012), we expected that microbiota manipulations could affect lipid content, particularly in high vs low dietary sugar supply. No such effect was detected. However, antibiotics treatment slightly increased carbohydrate content (glucose and glycogen) under the poorest nutritional conditions (2:2), similarly to Ridley et al. (2012). Interestingly, microbiota disruption showed opposite effect (reduced glucose content) under sugar-rich conditions (16:2). This contrasted response to microbiota alteration according to diet is likely connected to nutrient- and bacteria-dependent regulation of insulin pathways, known to promote high levels of free glucose when down-regulated (Teleman, 2009). Alteration of energy reserves by microbiota could result from many kinds of host-microbiota relationships, including changes in host's behavior and dietary preference (Douglas, 2018). However, we failed to identify any “buffering” effect of microbiota on yeast appetite as it is described by Leitão-Gonçalves et al. (2017), even when the nutrient supply was low. The fact that we did not use chemically defined medium, and therefore had limited control on specific amino acid content of the food may explain this divergence. The most striking effect of microbiota was on development. Antibiotics treatment amplified the developmental delay, especially in flies reared on food overloaded with sugar (from +1d in balanced diets 8:8 and 16:16 to +4d in 16:2), but without affecting the poorest diet (2:2). It was previously found that microbiota effects on development and growth regulation are stronger in yeast-poor nutritional environments (Shin et al., 2011). Furthermore it is often seen that microbiota can mitigate the effects of protein undernutrition by synthesizing amino acids and vitamins that become available for the host and therefore attenuate developmental delay (Sannino et al., 2018; Yamada et al., 2015). Here we do not observe such effects. We rather show that microbiota seems to mitigate developmental latency induced by excessive sugars. Whether microbiota can limit the effects of dietary sugars by consuming them (Chaston et al., 2016; Huang and Douglas, 2015), by reshaping the metabolism and change the use of energy reserves (Ridley et al., 2012; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011), by depressing the glucose supply via the production of acetic acid (Johnston et al., 2010; Ridley et al., 2012), or by other unknown means, needs to be investigated. Nonetheless, unlike Ridley et al. (2012) we did not detect any significant impact of the antibiotic treatment on oxygen consumption or RQ, whatever the diet. This is surprising because glucose represent the

main fuel for respiration activity, and microbiota-induced changes in carbohydrates reserves were therefore expected to trigger metabolic rate changes.

Consequences of diet-microbiota interactions on stress tolerance

Considering the role of microbiota in nutrition (Douglas, 2009) and the role of nutrition in stress tolerance (Andersen et al., 2010; Sisodia and Singh, 2012), we expected to observe marked responses in stress tolerance traits related to both diet and microbiota. Contrary to this expectation, we did not detect any effect of diet or microbiota disruption on heat stress tolerance (fig. 5B & D). These results contrast with those of Andersen et al. (2010) and Sisodia and Singh (2012) who found that protein-rich diets improved heat stress tolerance, although diets and metrics used to assess tolerance are not directly comparable. In this study, we observed no more than half a degree difference between CT_{max} of the more tolerant flies and the less tolerant ones. This is in line with the general idea that heat tolerance is much less plastic than cold tolerance in *Drosophila* (Sørensen et al., 2016). In contrast, resistance to cold stress was much more responsive to dietary conditions and manipulation of microbiota. Cold knockdown temperature showed rather small effect of diets (2:16 flies fell into coma at slightly lower temperatures than other diets), and a larger and consistent beneficial effect of microbiota disruption. Conversely, acute cold stress survival was only weakly dependent on microbiota, but strongly dependent on nutrition. Low caloric content increased cold survival compared to rich diets. Thus, our set-up allowed to highlight a positive effect of dietary restriction on cold tolerance that has not been previously observed (Burger et al., 2007; Partridge et al., 2005). It should be noted that our restriction was more severe than that of Burger et al (2007) who used a restrictive diet comparable to our intermediate diet (8:8). Both the imbalanced diets (2:16 and 16:2) also showed rather good cold survival compared to the balanced one at similar caloric content (8:8). Cold knockdown temperature and acute cold stress survival have been shown to be highly correlated and good estimators of overall cold tolerance (Andersen et al., 2015). However, divergence between both metrics is not surprising since chill coma and survival to acute stress are relying on different mechanisms, namely the ability to delay stress damages vs the ability to recover over time (Andersen et al., 2018; Overgaard and MacMillan, 2017), that may have been affected or not by diets and microbiota. The lower knockdown temperature in yeast-rich and sugar-poor diet 2:16 diet is consistent with previous observations that excess in dietary sugar is not necessarily beneficial for cold tolerance (Colinet et al., 2013) and that yeast in diet favors cold tolerance, especially when the yeast is alive (Colinet and Renault, 2014; Jiménez Padilla, 2016; Le Bourg et al., 2015). In fact, increased cold tolerance of microbiota-disrupted flies may be linked to the unexpected increased yeast gut content that resulted from bacterial disruption treatment (fig. 2B). While the focus is often on bacteria as main gut symbionts, the reduced attention on yeasts may not be deserved (Hoang et al., 2015). Yeasts, especially persisting ones, can largely affect

Drosophila physiology and increase survival to cold stress, but also to infection and starvation (Le Bourg et al., 2015; Le Rohellec and Le Bourg, 2009).

Starvation tolerance was improved in sugar rich diet particularly when yeast was absent. This is not surprising since the higher lipid content of sugar fed flies has been shown to provide better tolerance to starvation in other *Drosophila* species (Ballard et al., 2008). Interestingly we did not find any effect of caloric restriction on starvation tolerance, maybe due to the age-dependent nature of this phenomenon (Burger et al., 2007). Antibiotic treatment had only little influence on this trait, but still significantly reduced starvation tolerance in the richest diet (16:16). Yet, this result is coherent with microbiota lack of effect on lipid reserves.

Desiccation tolerance responded less than expected to dietary and microbial manipulations. Dietary and microbiota manipulations have previously been shown to play a role in synthesis of cuticular lipids (Fedina et al., 2012; Heys et al., 2018a; Sharon et al., 2010), a family of molecules affecting water retention of insects (Gibbs et al., 1997). Yeasts and sugar content, especially, were found to lead to opposite cuticular hydrocarbons profiles, with short chain molecules in yeast rich, and long chain molecules in sugar rich diets (Fedina et al., 2012). Chain length in cuticular hydrocarbons is positively correlated to desiccation resistance both in laboratory and along natural geographical gradients (Foley and Telonis-Scott, 2011; Rouault et al., 2004). In addition, changes in metabolic rate between diets should also affect tolerance of flies since increased gas exchanges tend to amplify dehydration (Gibbs et al., 2003). In spite of this, we found no microbiota effect and only limited dietary effect on desiccation. Flies from diets with higher content in sugar were slightly better at dealing with dehydration stress than those with reduced amount of sugar in the diet. Lipid content was higher in these flies, and this type of reserves is well suited for tolerance to hydric stress since lipids oxidation represent a decent source of water (Arrese and Soulages, 2010), which could explain part of the observed effect.

Conclusions

Overall, we showed that diet composition is much more important than diet caloric content for most of the measured traits in this study. Flies from both imbalanced diets with similar intermediate caloric contents exhibited divergent developmental responses, energy metabolism and stress tolerance. On the other hand, variations in caloric content generated flies displaying divergent response patterns only under severe caloric restriction. The combined restriction of sugar and yeasts often led to similar responses than yeast-deprived but sugar-rich diets, suggesting yeast content was the main driver of observed changes. Flies reared on yeast-poor diets, irrespective of the sugar content, could be characterized by slow development, low body mass, large energetic reserves, high metabolic rate and increased stress tolerance. We did also observe some effects that were not directly related to yeast content, but these were typically of lesser amplitude. Microbiota altered

many traits in interaction with diets, but the strength of these effects was always minor compared to the one of diets, except for CT_{min} . In addition, we failed to replicate the observation of hyperlipidemia, hyperglycemia and reduced metabolic rate previously detected in axenic flies (Ridley et al., 2012; Wong et al., 2014). The absence of marked microbial effects could be related to our experimental procedure that did not generate perfectly axenic individuals. Though antibiotics effectively eliminated bacteria, they also allowed yeasts to thrive even more than in conventional flies. Hence it is unclear whether observations are the consequence of bacteria elimination or of yeast growth. This study mainly shows that diets composition, is a key parameter for *Drosophila* biology. Microbiota alterations show some interesting consequences on the development of individuals on imbalanced diets that opens doors to further explorations, especially regarding stress tolerance.

Supplementary material

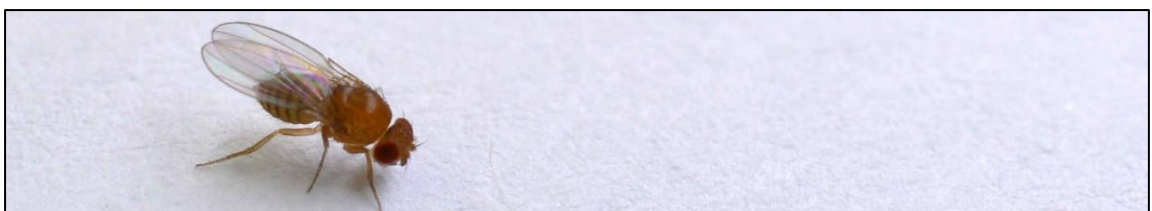
Table S1: Tukey HSD pairwise differences for all presented traits, between food conditions (regrouping antibiotic treated and untreated individuals), or comparing all food x microbiota combinations. Different letters indicate significant differences, and same letters no detected effect (threshold $p < 0.01$). Bonferonni-Holm correction for multiple comparison was used.

	Food differences					All differences									
	2:2	8:8	16:16	2:16	16:2	2:2	2:2'	8:8	8:8'	16:16	16:16'	2:16	2:16'	16:2	16:2'
Bacterial CFU	a	b	ab	ab	ab	ab	a	c	ab	c	a	c	a	bc	ab
Yeast CFU	ab	bc	c	ac	b	a	bc	a	c	bc	c	ac	c	a	ab
Fresh mass	a	b	bc	c	a	a	ab	c	c	c	bc	c	c	a	a
Water content	c	a	a	b	a	e	de	ab	ab	ab	a	cd	bc	ab	ab
Total lipid	a	b	b	a	b	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b
Glucose content	c	a	a	a	b	d	e	b	ab	ab	a	a	ab	d	c
Glycogen content	c	b	ab	a	c	bc	d	ab	ab	ab	ab	a	a	cd	bc
Development rate	d	b	c	a	e	e	e	ab	cd	bc	d	a	ab	f	g
O2 consumption	a	b	c	b	a	a	a	b	bc	bc	c	bc	b	a	a
RQ	b	b	b	a	c	bc	cd	cd	bd	bc	bc	ab	a	d	cd
Food preference	c	ab	a	ab	b	c	c	ab	ab	ab	a	abc	abc	ab	bc
Total food consumption	c	ab	a	ab	b	c	c	ab	abc	ab	a	ac	bc	a	a
Cold stress survival	c	a	a	b	bc	c	c	a	a	a	a	b	bc	bc	bc
Cold knockdown temperature	b	b	b	a	b	c	a	b	a	b	a	a	a	bc	a
Heat stress survival	b	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Heat knockdown temperature	a	a	a	a	a	bc	ac	bc	bc	ac	ab	ac	a	c	ac
Dessication tolerance	-	-	-	-	-	ab	ab	a	ab	a	a	ab	b	ab	ab
Starvation tolerance	-	-	-	-	-	bc	b	bc	b	cd	b	a	a	d	d

Chapitre 3 - La surpopulation larvaire : un stress nutritionnel affectant l'hôte et son environnement

“When a place gets crowded enough to require ID's, social collapse is not far away. It is time to go elsewhere. The best thing about space travel is that it made it possible to go elsewhere.”

Robert A. Heinlein (1973) Time Enough for Love.



Article 3 - Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in *Drosophila* flies

In this chapter 3, we wanted to develop the topic of larval crowding in *D. melanogaster*. Larval crowding is a complex stress because it affects individuals through multiple changes of the environment (Botella et al., 1985; Vijendravarma et al., 2013). Changes include a quantitative reduction of the food availability, a qualitative degradation of the food, and an increased interindividual competition. Because of this complexity, the effects of crowding are not fully characterized yet. In particular, several studies reported a beneficial effect of crowding for heat tolerance, but some others found no effect or even an opposite effect (Arias et al., 2012; Loeschcke et al., 1994; Sørensen et Loeschcke, 2001). Previous works showed that crowding can positively affect flies' longevity through homeotic effect at mild densities (*e.g.* Le Bourg, 2015). Thus, we hypothesized that crowding effects on thermal tolerance could similarly result from hormetic phenomenon. We tested this assumption by comparing the stress tolerance of flies reared at several larval densities.

Main findings:

- 1) High larval density led to drastic life-history traits impairments (size, development speed), and we evidenced the extreme viable limits of this developmental plasticity.
- 2) Thermal tolerance (to heat but also to cold) was improved in replicated experiments, and the effects were more marked at medium than at high density.
- 3) Metabolic profiles were completely different from one density to another. Notably, higher densities showed accumulation of circulating carbohydrates, known for promoting thermotolerance.
- 4) Overexpression of genes coding for HSP or antioxidants enzymes was not found at medium or high density, suggesting this mechanism is unlikely to explain observed hormetic cross-tolerance changes.
- 5) Urea, a metabolic waste, accumulated substantially in the food, but not in *D. melanogaster* larvae.
- 6) Urea showed potential for improving tolerance to cold stress when supplied in small amounts.

RESEARCH ARTICLE

Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in *Drosophila* flies

Youn Henry¹, David Renault^{1,2} and Hervé Colinet^{1,*}

ABSTRACT

Crowding is a complex stress that can affect organisms' physiology, especially through decreased food quality and accessibility. Here, we evaluated the effect of larval density on several biological traits of *Drosophila melanogaster*. An increasing gradient, from 1 to 1000 eggs per milliliter of food, was used to characterize life-history traits variations. Crowded conditions resulted in striking decreases of fresh mass (up to 6-fold) and viability, as well as delayed development. Next, we assessed heat and cold tolerance in L3 larvae reared at three selected larval densities: low (LD, 5 eggs ml⁻¹), medium (MD, 60 eggs ml⁻¹) and high (HD, 300 eggs ml⁻¹). LT₅₀ values of MD and, to a lesser extent, HD larvae were repeatedly higher than those from LD larvae, under both heat and cold stress. We investigated potential physiological correlates associated with this density-dependent thermotolerance shift. No marked pattern could be drawn from the expression of stress-related genes. However, a metabolomic analysis differentiated the metabolotypes of the three density levels, with potential candidates associated with this clustering (e.g. glucose 6-phosphate, GABA, sugars and polyols). Under HD, signs of oxidative stress were noted but not confirmed at the transcriptional level. Finally, urea, a common metabolic waste, was found to accumulate substantially in food from MD and HD larvae. When supplemented in food, urea stimulated cold tolerance but reduced heat tolerance in LD larvae. This study highlights that larval crowding is an important environmental parameter that induces drastic consequences on flies' physiology and can affect thermotolerance in a density-specific way.

KEY WORDS: Cold stress, Heat stress, Larval density, Metabolic response, Stress response, Urea

INTRODUCTION

The density of individuals in a population is likely to fluctuate with food accessibility. A sudden increase of trophic resources can result in a burst of reproduction, leading later to a crowding situation (Atkinson, 1979; Nunney, 1990). This is especially true for species with a short life cycle and high reproductive capacity such as many insects. When the population density overruns a given threshold (i.e. crowding), severe detrimental effects may arise (Kovács and Csermely, 2007). In *Drosophila* species, for instance, delayed development, lower fecundity, cannibalism and decreased emergence success are common consequences of crowding (Lints and Lints, 1969; Scheiring et al., 1984; Borash et al., 2000; Kolss

et al., 2009; Vijendravarma et al., 2012). These defects result from both a quantitative (e.g. food restriction) and a qualitative (e.g. overconsumption of toxic wastes) deterioration of food supply (Scheiring et al., 1984; Botella et al., 1985; Borash et al., 1998) as well as inter-individual scramble competition. Crowding can thus be considered as a complex multifactorial stressor.


While crowding can be deleterious to insects, it can also have positive effects, sometimes viewed as Allee effects (Wertheim et al., 2002). Several studies have reported increased lifespan (e.g. Miller and Thomas, 1958; Lints and Lints, 1969; Zwaan et al., 1991; Dudas and Arking, 1995; Shenoi et al., 2016), enhanced starvation tolerance (Mueller et al., 1993), increased additive genetic variance (Imasheva and Bublly, 2003) or elimination of fungal growth (Wertheim et al., 2002) under crowded conditions. However, some of these effects remain controversial as a result of inconsistent observations or limited experimental support (Baldal et al., 2005; Moghadam et al., 2015).

In the wild, crowding occurs in ephemeral and isolated habitats; for example, rotting fruits, where fruit fly larvae are forced to cope with multiple stressors, including thermal stress (see Feder et al., 1997; Warren et al., 2006). Several authors have reported that heat stress tolerance could be promoted by crowding in *Drosophila* adults (Quintana and Prevosti, 1990; Bublly et al., 1998; Sørensen and Loeschcke, 2001; Arias et al., 2012), while other studies reported no effect (Oudman et al., 1988) or even decreased stress tolerance (Loeschcke et al., 1994). These discrepancies may result from different methodological approaches among studies, and from the focus on adult stage despite the fact that crowding occurs at the larval stage and thus primarily affects larvae.

Hypotheses to explain the promoting effect of crowding on heat tolerance are diverse. For example, Quintana and Prevosti (1990) proposed the existence of a close pleiotropism between lifespan traits and thermal stress traits, Bublly et al. (1998) suggested that metabolic alterations could be responsible for enhanced heat knockdown resistance at high densities, and Loeschcke et al. (1994) argued that size/surface ratio variations may affect thermotolerance. Sørensen and Loeschcke (2001) first tested the existence of mechanistic links between crowding and thermal stress tolerance. These authors observed small but significant larval heat-shock protein 70 (HSP70) up-regulation correlated with enhanced heat stress tolerance of adults raised under high larval density. This induction of stress-related proteins could be triggered by increased amount of toxic waste, like urea, produced by larvae during intense crowding (Botella et al., 1985), urea being known as a protein denaturant (Yancey and Somero, 1980; Somero and Yancey, 1997). Larval crowding can also induce activation of the antioxidant defense system (Dudas and Arking, 1995), involving ubiquitous genes from the cellular stress response able to limit the detrimental effects of many stressors (Kültz, 2005). More recently, a study found that larval crowding affected lipid profiles (Moghadam et al., 2015); the study provides a putative, yet

¹UMR CNRS 6553 Ecobio, Université de Rennes 1, 263 Avenue du General Leclerc, CS 74205, 35042 Rennes Cedex, France. ²Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, 75231 Paris Cedex 05, France.

*Author for correspondence (herve.colinet@univ-rennes1.fr)

 H.C., 0000-0002-8806-3107

unexplored, mechanism explaining this effect, as changes in membrane lipid composition have been associated with thermotolerance shifts in insects (Overgaard et al., 2006; Shreve et al., 2007).

In the available literature, experimental designs of crowding-related studies were often based on comparisons between two larval densities, referred as low and high density (see Table S1 for a brief review). The choice of these larval densities was often heterogeneous, and not clearly justified. As the relationship between crowding and biological traits is not necessarily linear (Prout and McChesney, 1985), insightful interpretations strongly depend upon the initial selected densities.

In the present study, we aimed to decipher the effects of larval crowding on several biological traits of *D. melanogaster*. The first step was to find a 'viability threshold', i.e. a larval density over which viability becomes insignificant (<10%). To do so, we used a broad larval density gradient, and characterized the consequences of larval density on life-history traits (e.g. viability, development duration and body mass). Based on these life-history data, we selected three contrasted larval densities (considered as non-, mildly and highly stressful), under which we tested larval thermotolerance (using cold and heat stress). Because of the non-linearity of effects of larval density on biological traits (Prout and McChesney, 1985), we assumed that intermediate density may trigger a hormetic-like response improving thermotolerance, while intense crowding would become deleterious. As metabolic by-products accumulate in food under crowding (Botella et al., 1985), we measured urea concentration, assuming that it would accumulate in both food and larvae at high rearing densities. Next, we measured thermotolerance of *D. melanogaster* larvae reared on urea-supplemented food to test whether urea could mediate the observed effects on thermotolerance.

We also searched for physiological correlates of crowding. Antioxidant enzymes and HSPs have been linked to crowding stress (Dudas and Arking, 1995; Sørensen and Loeschcke, 2001). The activity of some enzymes associated with oxidative stress has been shown to vary with larval density (superoxide dismutase but not catalase or glutathione *S*-transferase), but in a genotype- and stage-specific manner (Dudas and Arking, 1995). In addition, despite an increase in HSP70 level in larvae reared under crowded conditions (Sørensen and Loeschcke, 2001), the regulation of other members of the HSP family has not been investigated. Here, we tested whether crowding caused the accumulation of oxidant molecules in larvae (H_2O_2), and whether it could impact the expression of various genes coding for antioxidant enzymes and members of the HSP family. Finally, considering that dietary modifications can strongly affect the fly metabolome (Colinet et al., 2013; Colinet and Renault, 2014), we tested whether different levels of crowding, associated with quantitative and qualitative alteration of nutritional supply, would also result in different metabolotypes.

MATERIALS AND METHODS

Stock population

We conducted the experiments on a laboratory population of *D. melanogaster* Meigen derived from wild individuals collected in September 2015 in Brittany (France). Fly stocks were maintained on standard fly medium comprising inactive brewer's yeast (MP Bio 0290331205, MP Bio, Santa Ana, CA, USA; 80 g l⁻¹), sucrose (50 g l⁻¹), agar (Sigma-Aldrich A1296, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 10 g l⁻¹), supplemented with Nipagin (Sigma-Aldrich H5501; 8 ml l⁻¹) in 100 ml bottles, at 25°C (12 h light:12 h dark). Unless stated otherwise, these conditions were also used for rearing of flies in the following experiments.

Larval density treatments

Prior to the experiment, we allowed adult flies from rearing stock to lay eggs for 6 h on Petri dishes filled with standard food. Using a binocular microscope, eggs were then counted, delicately collected with a paint brush, and transferred into new 50 ml vials (23 mm diameter) containing 2 ml of food, in order to achieve the desired larval density (Fig. S1).

Effects of larval crowding on life-history traits

In the first experiment, we tested a broad range of larval densities: 1, 5, 20, 60, 100, 200, 300, 500 and 1000 eggs ml⁻¹ food (see pictures of the different treatments in Fig. S1). To generate these nine density treatments, a total of 180, 180, 200, 240, 200, 400, 600, 1000 and 2000 eggs were counted and deposited in 90, 18, 5, 2, 1, 1, 1 and 1 vials respectively, each with 2 ml of food. Viability was calculated based on the number of emerged adults over the total number of deposited eggs. The development duration (from egg to adult) was recorded from emerging individuals by checking their emergence twice a day. Adult fresh and dry masses were measured for both sexes from 30 randomly collected individuals per density (3 day old adults) using a micro-balance (Mettler Toledo UMX2, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland; accurate to 1 µg). Dry mass was measured after individuals were dried out for at least 1 week at 60°C.

Larval density effects on thermotolerance

In the second part of the study, we reared flies under three larval density conditions: low (LD; 5 eggs ml⁻¹), medium (MD; 60 eggs ml⁻¹) and high density (HD; 300 eggs ml⁻¹). These three densities were selected based on life-history measurements (see above) and represent non-, mildly and strongly stressful larval crowding conditions. When individuals reached the wandering third instar (L3), they were delicately collected with a paint brush (larvae from different rearing vials were randomly pooled by density), and transferred by groups of 10 individuals into fresh food vials (the sex was not determined for larvae). For each density condition, 18 of these vials were then directly immersed into thermoregulated bath, filled with 70% ethylene glycol mixed with 30% water, and set at 38±0.1°C for assessment of heat stress, or at -3±0.1°C for cold stress (*N* per density per assay: 18 vials×10 individuals=180). In both tests, the acute stress exposure lasted for a maximum of 120 min. Over this period, two vials per condition were removed from the bath every 15 min, thus resulting in nine exposure durations. After the stress, vials were transferred to standard conditions for larval development (25°C, 12 h light:12 h dark), and survival was scored as the number of emerged adults. Within a given generation of experimental flies, we performed pairwise comparisons of either LD versus MD or LD versus HD (hereafter, the use of 'LDa' refers to LD flies used for the comparison between LD and MD, and 'LDb' refers to LD flies used for the comparison between LD and HD). LDa versus MD comparison was replicated three times, and LDb versus HD comparison was replicated twice, all replicates being from distinct generations. Third instar wandering larvae from the three density treatments were also collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

Urea effects on thermotolerance

We conducted additional thermotolerance assays with larvae reared on media supplemented with increasing amounts of urea (Sigma-Aldrich U5378) to obtain the following urea concentrations: 0 (control), 2, 5 and 10 mg of urea added per milliliter of food. These larvae were all reared under the LD condition (i.e. 5 eggs ml⁻¹), and acute cold and heat tolerance were tested as described above.

Triglyceride assay

Triglycerides (TAGs) and glycerol measurements were performed using the colorimetric method with triglyceride reagent (Sigma-Aldrich T2449) as described in Tennesen et al. (2014). Briefly, five frozen third instar larvae were homogenized in liquid nitrogen using a pestle to obtain a fine powder which was then diluted in 300 μ l of PBS-Tween 0.05%. Enzymes were heat inactivated (10 min at 70°C) and optical density was measured at 540 nm using a 96-well plate reader (Molecular Devices VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) after the addition of free glycerol reagent (Sigma-Aldrich F6428). Quantification was done by a calibration curve using a glycerol standard (0–1 mg ml⁻¹ range). Ten biological replicates were performed for each larval density.

Urea assay

Urea concentration was determined using a Urea Assay Kit (Abnova KA1652, Abnova, Taipei, Taiwan) according to the manufacturer's instructions. Briefly, larvae (10 individuals) and food (50 mg) from each experimental condition were homogenized in, respectively, 250 and 500 μ l of cold PBS, using a tungsten-bead beating apparatus (Retsch MM301, Retsch GmbH, Haan, Germany; 20 Hz, 3 min). All samples were kept on ice and processed shortly afterwards (<15 min) to avoid melanization of homogenates. Optical density was measured at 530 nm using a 96-well plate reader (Molecular Devices VersaMax). Quantification was done based on a calibration curve using a urea standard (0–5 mg ml⁻¹ range). Ten biological replicates were performed for the larvae samples, and 7–10 replicates for the food samples.

Hydrogen peroxide assay

The hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in larvae samples was measured using Amplex Red (Invitrogen A 12222, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the protocol described in Chakrabarti et al. (2014). Briefly, for each replicate, 10 larvae were homogenized in 300 μ l of cold Ringer solution, using a tungsten-bead beating apparatus (Retsch MM301; 20 Hz, 3 min). All samples were kept on ice and processed shortly afterwards (<15 min) to avoid melanization of homogenates. Fluorescence was measured at 550 nm (excitation) and 590 nm (emission) using a spectrofluorometer (SAFAS Monaco Xenius XC, Monaco). Quantification was done by a calibration curve using a H₂O₂ standard (0–10 μ mol l⁻¹ range). Preliminary tests showed that a 30- to 100-fold dilution was necessary to stay within the linear range of the standard curve. Ten biological replicates were performed per density condition.

Gene expression assays

RNA extraction was performed using a Nucleospin Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the protocol described in Colinet et al. (2010). For the three larval densities (LD, MD, HD), RNA was extracted from four replicates, each consisting of 10 larvae. RNA was then diluted in RNase-free water in order to standardize concentrations at 500 ng of total RNA, and then reverse-transcribed to cDNA using the Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. We quantified the transcript abundance of 15 genes involved in protein chaperoning, oxidative stress defense or the urea cycle as well as three housekeeping genes as reference through qRT-PCR (for primer sequences, see Table S2). Only *RpS20* was kept as a reference housekeeping gene as it showed high stability in all experimental conditions. Reactions were performed in a LightCycler® 480 system (Roche, Basel, Switzerland) with

SybrGreen I mix (Roche) according to Colinet et al. (2010). Relative expression ratios were computed using the $\Delta\Delta$ Ct method (Pfaffl, 2001).

Metabolic profiling

Metabolic profiles of larvae from LD, MD and HD treatments were compared. Two different LD controls were used, LDa and LDb, corresponding to control larvae from the same generations as larvae from MD and HD treatments, respectively. Fresh mass of each sample was measured (Mettler Toledo UMx2) before metabolite extractions. Sample preparation and derivatization were performed as previously described in Colinet et al. (2016) with minor modifications. Briefly, after homogenization in 750 μ l of ice-cold methanol–chloroform solution (2:1, v:v) and phase separation with 500 μ l of ultrapure water, a 100 μ l aliquot of the upper phase was vacuum-dried. The dry residue was resuspended in 30 μ l of 20 mg ml⁻¹ methoxyamine hydrochloride in pyridine before incubation under automatic orbital shaking at 40°C for 60 min. Then, a volume of 30 μ l of BSTFA was added and the derivatization was conducted at 40°C for 60 min under agitation. A CTC CombiPal autosampler (PAL System, CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) was used, ensuring standardized sample preparation and timing. Metabolites were separated, identified and quantified using a GC/MS platform consisting of a Trace GC Ultra chromatograph and a Trace DSQII quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The temperature was increased from 70 to 170°C at 5°C min⁻¹, from 170 to 280°C at 7°C min⁻¹, and from 280 to 320°C at 15°C min⁻¹, and then the temperature was held at 320°C for 4 min. We completely randomized the injection order of the samples. All samples were run under the SIM mode rather than the full-scan mode. We therefore only screened for the 63 pure reference compounds included in our custom spectral database. Calibration curves for 63 pure reference compounds at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 750, 1000 and 1500 μ mol l⁻¹ concentrations were run concurrently. Chromatograms were deconvoluted using XCalibur 2.0.7, and metabolite levels were quantified using the quadratic calibration curve for each reference compound and concentration. Quality controls at concentrations of 200 μ mol l⁻¹ were run every 15 samples. A total of 44 metabolites was detected and quantified from our samples.

Data analysis

Data analysis was mainly performed using R software v3.3.1 (R Development Core Team 2016). Binomial generalized linear models (GLM) were fitted to survival data from thermotolerance assays using a logit link function, followed by a deviance analysis and Tukey tests computed using the 'multcomp' package (Hothorn et al., 2008) in order to test for pairwise differences. Masses (fresh and dry), as well as viability and development duration, were analyzed using non-linear models, with custom formulations of the logistic equation proposed by Börger and Fryxell (2012). For mass, we used the formulation:

$$\text{Mass} = d + \frac{a}{1 + \exp[(\text{larval density} - b)/c]}, \quad (1)$$

where $(a+d)$ corresponds to the asymptotic mass at density=0, b is the inflection point expressed in density units, c is the range of the curve on the density axis, and d is the asymptotic mass at the highest density. We used properties of the equation to define 'decreasing mass threshold' ($=b-3\times c$) and 'stabilization threshold' ($=b+3\times c$).

For viability and development duration, we used the formulation:

$$\% \text{Emerging adults} = \frac{a}{1 + \exp[(b - \text{time})/c]}, \quad (2)$$

where a corresponds to the endpoint viability, b is the inflection threshold expressed in time units, and c is the range of the curve on the time axis. This equation was convenient because at $\text{time} = b + 3c$, we knew that measurements reached 95% of a , and we used this time value as an estimation of development duration for 95% of total emerging adults. Relative gene expression differences between treatments were tested using t -tests. Metabolomics data were analyzed using between-principal components analysis (PCA) (ade4 package) followed by Monte-Carlo test to look for significant differences between treatments. ANOVA were computed on TAG, urea and H_2O_2 measurements using Prism software v5.01 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Effect of larval density on life-history traits

At the highest density (1000 eggs ml^{-1} of food), we observed very low adult emergence (1.25% viability); only extreme individuals (outliers) that developed fast enough to limit the crowding stress were able to emerge. Because of the limited number of adults (6 females and 19 males out of 2000 individuals), data from this condition were not included in development, viability and body mass analyses. Emergence rate was strongly affected by the interaction of time and larval density (deviance analysis, $\chi^2 = 289.10$, d.f.=8, $P < 0.001$). The flies that were reared under extreme crowding conditions took about one more day to emerge compared with other crowding conditions (Fig. 1A). Moreover, viability dropped from

ca. 90% at the lowest larval density (1 egg ml^{-1} of food) to ca. 40% at high larval density (500 eggs ml^{-1} of food) (Fig. 1B). Both fresh and dry masses drastically decreased in both sexes with increasing larval density (Fig. 1C,D). While the dry mass remained rather stable at densities of 1, 5, 20 and 60 eggs ml^{-1} of food, it showed a clear drop-off from the 60 eggs ml^{-1} of food condition onwards [decreasing threshold ($b - 3c$) = 71 females, 51 males], before stabilizing at densities above 300 eggs ml^{-1} of food [stabilization threshold ($b + 3c$) = 339 females, 398 males] (Fig. 1D). Fresh mass decreased by more than 6-fold between extreme densities (e.g. 0.895 ± 0.062 versus 0.135 ± 0.013 mg for males at 1 and 500 eggs ml^{-1} , respectively) (Fig. 1C). Despite excluding the density of 1000 eggs ml^{-1} from analyses, mass measurements were consistent with those from a density 500 eggs ml^{-1} of food.

For all subsequent experiments, we focused on three contrasting densities: (1) low density (LD) at 5 eggs ml^{-1} of food, considered as not stressful (i.e. 80% viability, unaffected development duration and mass), (2) medium density (MD) at 60 eggs ml^{-1} of food, considered as mildly stressful (i.e. 55% viability but little to no effect on mass and development duration) and (3) high density (HD) at 300 eggs ml^{-1} of food, considered as stressful because of the dramatic phenotypic changes it caused (i.e. 55% viability, 60% mass decrease and >12 h delay of development duration).

Thermotolerance of larvae reared under crowded conditions

For all thermotolerance assays, survival decreased with duration of exposure ($P < 0.05$, Fig. 2). Cold tolerance was consistently higher in MD treatments compared with LD controls (Fig. 2) (deviance analysis, $\chi^2 = 44.09$, d.f.=1, $P < 0.001$; $\chi^2 = 31.09$, d.f.=1, $P < 0.001$; $\chi^2 = 44.92$, d.f.=1, $P < 0.001$; for replicates 1, 2, 3, respectively). Cold

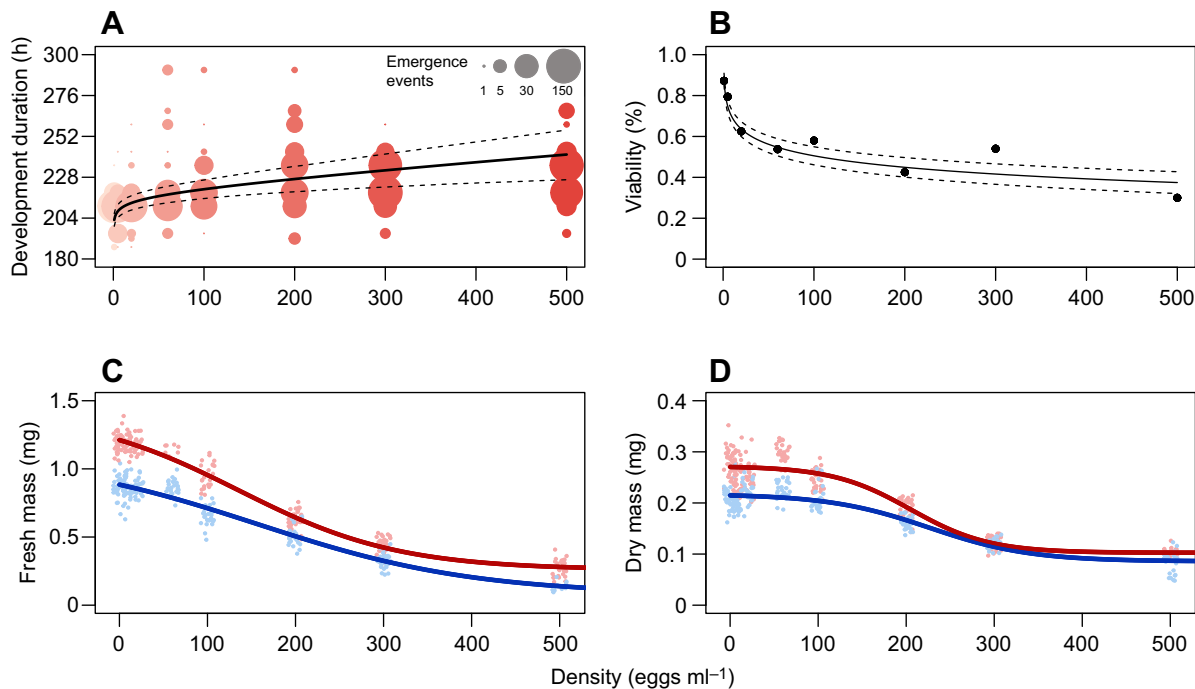


Fig. 1. Life-history traits of flies reared at increasing larval density. (A) Development duration from egg to adult. Circles: pooled observed emergence events at a given density of larvae and at a given scoring time. The color gradient indicates increasing larval density. Solid line: time needed for 95% of individuals to emerge (predicted using a non-linear model). Dotted lines: 95% confidence intervals. $N = 180, 180, 200, 240, 200, 400, 600, 1000$ at densities from 1 to 500 eggs ml^{-1} . (B) Egg to adult viability ratio. Circles: raw experimental observed egg to adult viability ratio. Solid line: viability ratio predicted using a non-linear model. Dashed lines: 95% confidence interval. $N = 147, 153, 125, 129, 116, 170, 324, 300$ at densities from 1 to 500 eggs ml^{-1} . (C) Wet mass and (D) dry mass of adult flies reared at increasing larval density (expressed as initial number of eggs ml^{-1}). Circles indicate raw data. Lines: non-linear model based on these data. Females are represented in red and males in blue. For mass, $N = 30$ in all treatments.

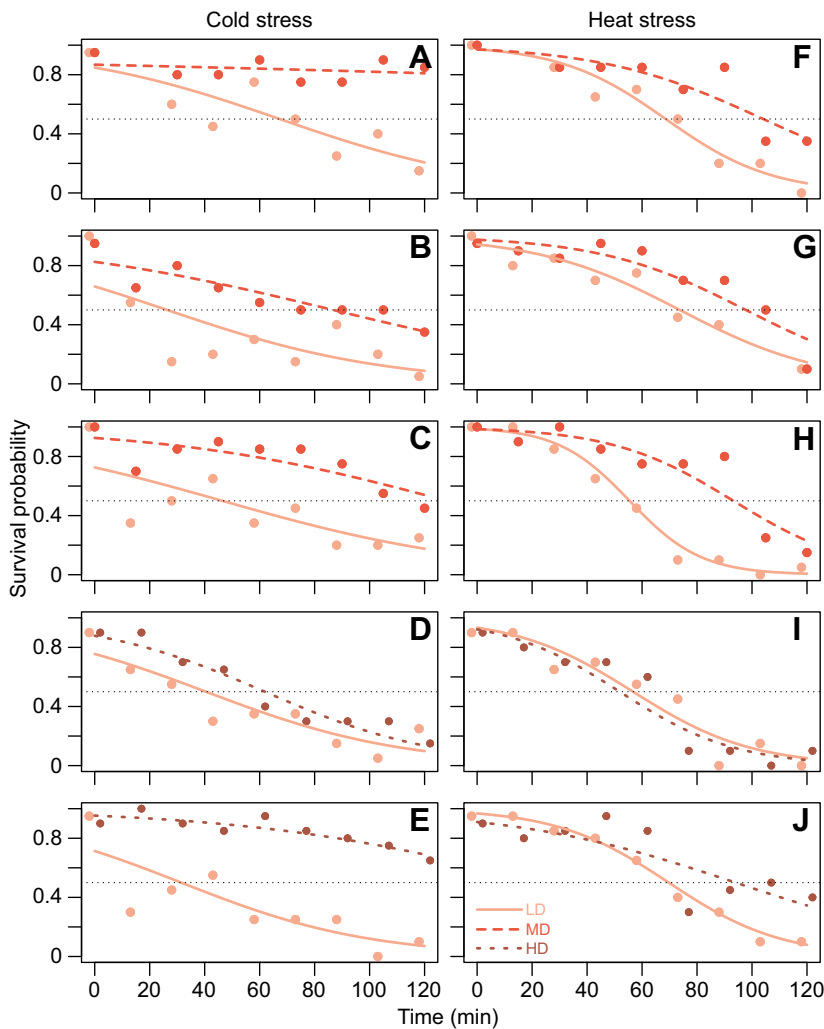


Fig. 2. Survival of third instar larvae as a function of exposure duration to acute cold ($-3\pm 0.1^\circ\text{C}$) or heat ($38\pm 0.1^\circ\text{C}$) for three experimental larval density conditions. Mortality was scored on adults 5–6 days after thermal stress. Data for increasing larval density (low, LD, 5 eggs ml^{-1} ; medium, MD, 60 eggs ml^{-1} ; and high, HD, 300 eggs ml^{-1}) are presented (see key). Left column: acute cold tests. Right column: acute heat tests. A–C for cold and F–H for heat are three replicates of the pairwise comparison of LD versus MD; D and E for cold and I and J for heat are two replicates of the pairwise comparison LD versus HD. Each replicate was performed on separate generations. Lines: predictions from GLM models. Circles: raw data of survival proportion for a given exposure duration, based on 20 larvae. Nine exposure durations were tested (i.e. $N=180$ per treatment, per replicate).

tolerance was also higher in HD compared with LD larvae in both replicates ($\chi^2=6.48$, d.f.=1, $P<0.05$; $\chi^2=115.46$, d.f.=1, $P<0.001$), although large inter-generational differences were observed (Fig. 2D,E). LT_{50} (lethal time) values of LD larvae were consistently inferior to those of the other treatments (based on lack of overlap in 95% confidence intervals; Fig. 3).

Heat tolerance was higher for larvae reared under MD than under LD control, and this pattern was repeatedly observed for all replicated assays ($\chi^2=22.30$, d.f.=1, $P<0.001$; $\chi^2=6.76$, d.f.=1, $P<0.01$; $\chi^2=43.69$, d.f.=1, $P<0.001$; for replicates 1, 2, 3,

respectively) (Fig. 2F–H). The effect of crowding appeared less robust for HD larvae, with no significant difference between HD and LD larvae in one of the two replicates ($\chi^2=0.70$, d.f.=1, $P=0.41$; $\chi^2=5.31$, d.f.=1, $P<0.05$; for replicate 1, 2; Fig. 2I,J).

Urea production during crowding and effects on thermotolerance

First, we monitored urea concentration in food from the nine rearing conditions of the larval density gradient (Fig. 4A). We found that urea accumulated in food with increasing larval density

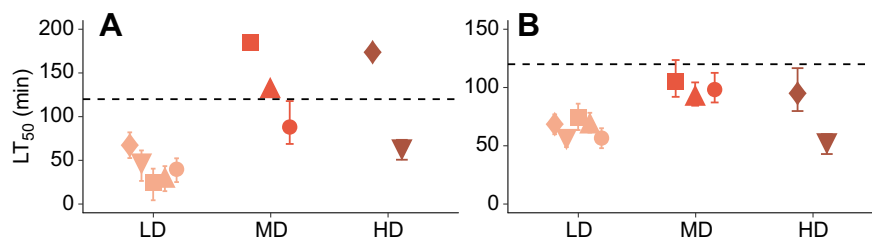


Fig. 3. Mean LT_{50} for third instar larvae exposed to increasing durations of acute cold ($-3\pm 0.1^\circ\text{C}$) or heat ($38\pm 0.1^\circ\text{C}$) stress. (A) Cold stress; (B) heat stress. Mortality was scored on adults 5–6 days after thermal stress. Data for increasing larval density (LD, MD and HD) are presented. Each symbol corresponds to one generation of flies. Error bars show 95% confidence intervals. Mean LT_{50} values and their 95% confidence intervals were calculated by simulating 1000 times the GLM model fitted on survival data. The dashed horizontal line shows the maximum stress exposure duration tested in the experiments. LT_{50} values above the dashed line are estimations based on conditions where 50% mortality was actually not reached by the end of the experiment. These points are thus shown without error intervals and need to be considered as extrapolations from models. For each LT_{50} , $N=180$.

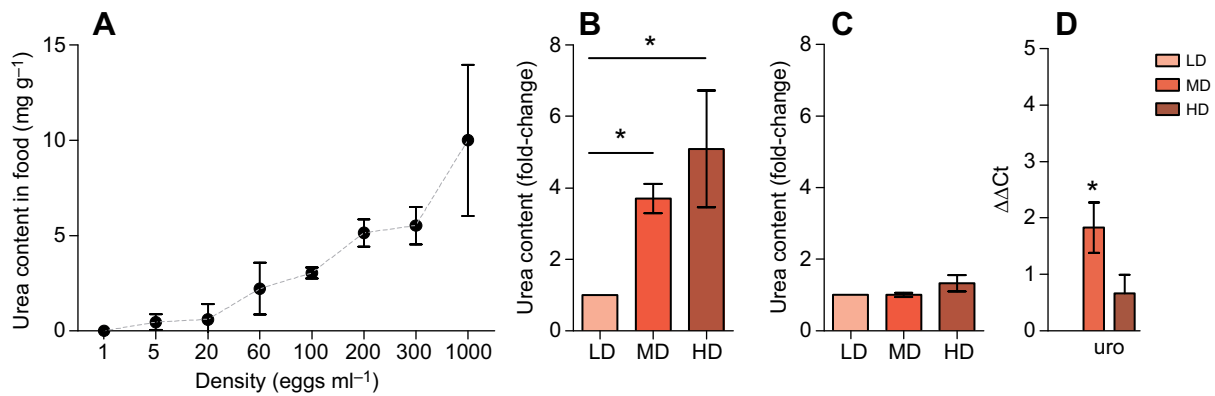


Fig. 4. Urea content in food and in larvae reared under crowded or uncrowded conditions. (A) Urea content in food, after the development of larvae, under conditions of increased crowding. Error bars show 95% confidence intervals. $N=7-10$ depending on the density treatment. (B,C) Urea content in (B) food and (C) L3 larvae reared at three larval densities (LD, MD and HD). Urea content is presented as a fold-change relative to the LD condition. Error bars show 95% confidence intervals. *Significant difference (Tukey HSD, $P<0.001$). In B, $N=7$ per density treatment; in C, $N=10$ per density treatment. (D) $\Delta\Delta\text{Ct}$ of qPCR Ct values, i.e. the \log_2 fold-change relative to the LD condition ($=0$) of the expression of the urate oxidase gene, *uro*. The values are expressed relative to expression of a reference housekeeping gene (*RpS20*). Each Ct was measured on four biological replicates. Error bars show s.e.m. *Significant difference (*t*-test, $P<0.05$).

($F_{7,15}=746.9$, $P<0.001$), reaching up to 10 mg of urea per gram of food at the highest larval density. Next, we measured urea concentration in both food and wandering larvae from LD, MD and HD conditions (Fig. 4B,C). We observed no significant increase of urea concentration in larvae ($F_{2,27}=1.92$; $P=0.16$; Fig. 4C), despite significant accumulation of this compound in food ($F_{2,23}=29.48$, $P<0.001$; Fig. 4B). Consistent with the previous assay, the urea level increased 5 times between the LD and HD conditions (Fig. 4B).

Artificial urea supplementation in food had a significant effect on cold survival of larvae ($\chi^2=22.98$, d.f.=3, $P<0.001$) (Fig. 5A). Survival was enhanced at intermediate concentrations (2 and 5 mg urea ml^{-1} of food) compared with the control with no added urea (Tukey HSD, $P<0.05$) (Fig. 5A). No difference was found between the highest concentration (10 mg urea ml^{-1} of food) and control (Tukey HSD, $P=0.21$). A global detrimental effect of urea supplementation was detected on heat tolerance ($\chi^2=303.08$, d.f.=3, $P<0.001$) (Fig. 5B).

Molecular changes induced by larval crowding

Expression of *uro* gene, coding for urate oxidase, showed significant up-regulation (*t*-test, $P<0.05$) in response to crowding, but only in MD larvae ($\Delta\Delta\text{Ct}=1.83$ corresponding to a 3.56-fold change compared with LD larvae, Fig. 4D). No significant change in expression was detected for genes implicated in the degradation

of reactive oxygen species [superoxide dismutase (*sod*) and glutathione synthase (*gs*)], except for the catalase gene (*cat*), which showed a significant upregulation in MD versus LD larvae (*t*-test; $P<0.05$) (Fig. 6A). For the other generic stress-related genes (i.e. molecular chaperones or co-chaperones), several significant differences were observed (Fig. 6C): (1) in MD versus LD larvae, upregulation of starvin gene (*stv*), heat-shock cognate 70 gene (*hsc70*) and *hsp40*, and downregulation of *hsp60*, *hsp27*, *hsp23*, *hsp26*, and *hsp68* (*t*-test; $P<0.05$), and (2) in HD versus LD larvae, upregulation of *stv* and downregulation of *hsp68* (*t*-test; $P<0.05$). However, all detected transcriptional changes aside from *uro* remained of relatively small magnitude, ranging from 2.12-fold (*stv* in MD) to 0.27-fold (*hsp68* in HD). Finally, fluorometric H_2O_2 measurements showed higher concentrations (2 times) in flies from HD conditions than in their relatives from LD or MD conditions (Tukey HSD, $P<0.001$) (Fig. 6B).

Forty-four metabolites were detected and quantified in our larval fly samples. A list of detected metabolites with their abbreviations is provided in Table S3. Trehalose and glucose were the most abundant detected metabolites. Changes in the level of each metabolite in relation to larval density treatments are shown in Fig. S2. The first and second principal components (PC1 and PC2) of the PCA represented 65.4% and 24.1% of total inertia, respectively. Monte-Carlo randomizations confirmed the significance of the differences among classes (observed $P<0.001$). PC1 mostly

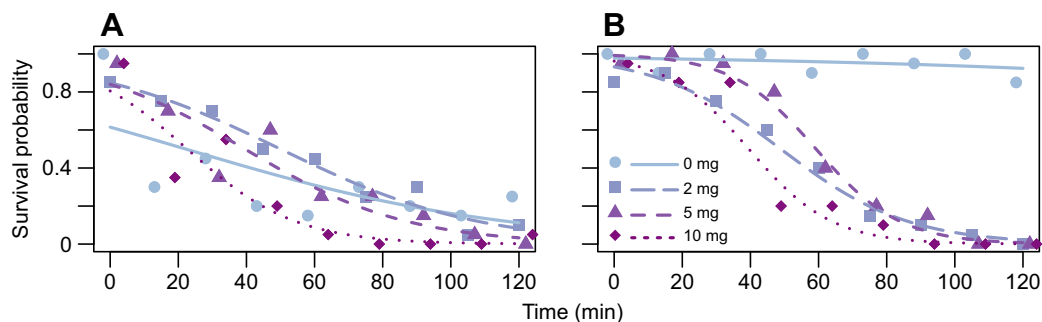


Fig. 5. Survival of larvae reared at LD with increasing urea supplementation following acute cold or heat exposure. Urea was present at 2, 5 and 10 mg ml^{-1} of food (control had no urea supplementation). (A) Cold stress; (B) heat stress. Symbols: raw data of survival proportion based on 20 larvae. Lines: predictions from GLM models. Nine exposure durations were tested (i.e. $N=180$ individuals per treatment, per stress). Survival was scored on emerging adult flies.

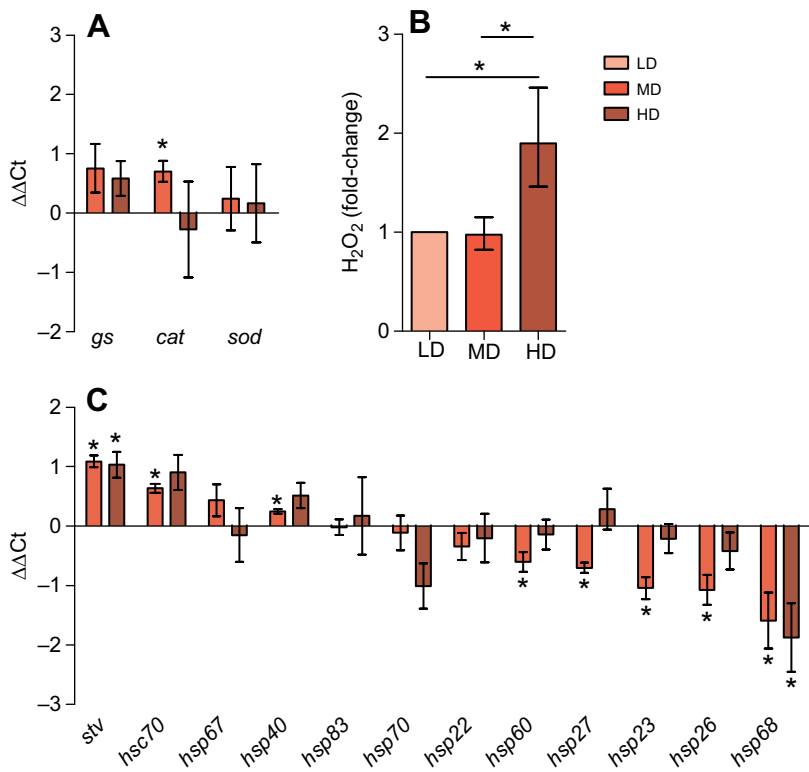


Fig. 6. Gene expression and oxidative stress levels during crowding. (A) $\Delta\Delta Ct$ of qPCR Ct values, i.e. \log_2 fold-change relative to the LD condition ($\Delta\Delta Ct$ LD=0), of the expression of genes involved in oxidative stress regulation. Error bars show s.e.m. (B) Relative internal H_2O_2 concentration in third instar larvae raised in LD, MD or HD conditions, and expressed as fold-change relative to the LD condition ($N=10$). Error bars show 95% confidence intervals. Density significantly impacts H_2O_2 concentration ($F_{2,27}=19.31$, $P<0.001$). *Significant difference (Tukey HSD, $P<0.001$). (C) $\Delta\Delta Ct$ of qPCR Ct values of the expression of genes involved in the general stress response. The values are expressed relative to expression of a reference housekeeping gene (*RpS20*). Each Ct was measured from four biological replicates. Error bars show s.e.m. *Significant difference from control LD condition (t -tests, $P<0.05$). gs, glutathione synthase; cat, catalase; sod, superoxide dismutase; stv, starvin; hsc, heat-shock cognate; hsp, heat-shock protein.

represented the increasing larval density, with a clear opposition between LD and HD larvae. Sugars (e.g. ranked by contribution to axis: maltose, trehalose, mannose, glucose), polyols (e.g. arabinol, galactitol, erythritol, mannitol) and acids (pipecolic acid, fumaric acid and malic acid) were positively correlated to PC1 (i.e. more abundant in MD and HD than in LD larvae), whereas amino acids were in general negatively correlated to PC1 (Fig. 7B). PC2 differentiated MD from LD and HD larvae, and some polyols were positively correlated to this axis (xylitol, sorbitol and glycerol 3-phosphate) as well as fructose (Fig. 7C). We also completed the metabolic analysis by measuring lipid content using colorimetric assays. No effect of density treatment was detected on TAG content ($F_{3,36}=1.79$, $P=0.16$) of larvae, but a significant effect of density treatment was detected on glycerol content ($F_{3,36}=14.29$, $P<0.001$), with larvae from the MD treatment showing higher concentrations than all other treatments (Tukey HSD, $P<0.001$) (Fig. S3).

DISCUSSION

In the present study, we assessed the effects of larval crowding on several biological traits of *D. melanogaster*. We found that both viability and development duration were impaired, even at moderate larval densities, and that viability was close to 0% at the highest tested density. Interestingly, body mass was rather stable for larval densities ranging from 1 to 60 eggs ml^{-1} of food, before dramatically decreasing to reach stable minimum values at larval densities over 300 eggs ml^{-1} of food.

In previous studies, simple pairwise comparison of control versus crowded conditions was often used, with larval densities generally ranging from 1 to 50 individuals ml^{-1} of food (Table S1). On this crowding range, our life-history traits measurements were consistent with the literature (e.g. Botella et al., 1985; Bierbaum et al., 1989). However, our data highlight that larvae of *D. melanogaster* can cope with much higher levels of larval crowding than those formerly considered as highly crowded. Hence, it is likely that the larval

densities used in many studies were only mildly stressful, and far from the tolerable limit for *Drosophila* flies. Accordingly, we showed that the highest tolerable larval crowding threshold (<90% mortality) falls in the range 500–1000 individuals ml^{-1} of food for *D. melanogaster*. This corresponds to the densities that were excluded from analyses as a result of excessive mortality in the work of Sarangi et al. (2016). Based on these observations, we selected three larval densities that we considered as non-, mildly and highly stressful, and subsequently investigated the thermotolerance of larvae.

Consistent with previous studies (Quintana and Prevosti, 1990; Bublil et al., 1998; Sørensen and Loeschcke, 2001; Arias et al., 2012), heat tolerance was superior in MD larvae compared with that in LD larvae, whereas this increase was less obvious in HD larvae. In parallel, cold tolerance was enhanced in MD and HD larvae compared with that of LD larvae, but the inter-replicate variance was high in individuals from HD conditions. As mortality increased with larval density, it is plausible that we selected extreme individuals, which could explain some of the phenotypic variation observed here. Limited and inconsistent effects of HD conditions on thermotolerance of larvae suggested that the priming effect was more effective at moderate (MD) than at very high (HD) larval densities (Figs 2 and 3). At very high larval density, the hardening-like effect generated by crowding could have been overwhelmed by the nutritional stress (i.e. food restriction and higher ingestion of toxic metabolic waste). In other words, our findings support the hypothesis that larval density may trigger a dose-dependent benefit on thermotolerance, which can be assimilated to a cross-tolerance hormesis response (Costantini et al., 2010).

The concept of hormesis is based on the genericity of stress response pathways (Calabrese and Baldwin, 2002; Sulmon et al., 2015), in which HSPs and proteins related to oxidative stress defense are prominent actors (Kültz, 2005). For instance, both the chaperoning activity of HSPs and antioxidant enzymes help cells to counterbalance cellular homeostasis disruption provoked by various

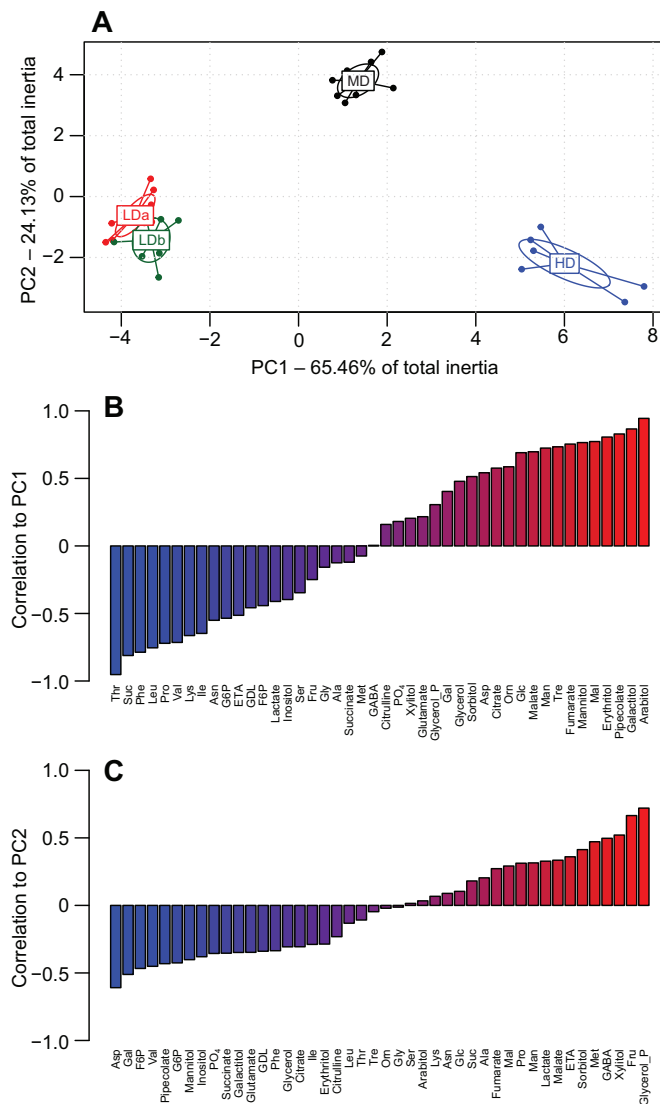


Fig. 7. Principal component analysis (PCA). (A) Between-PCA of metabolic profiles of *D. melanogaster* larvae reared at LD, MD or HD ($N=7-8$ per treatment). The first two principal components (PC1 and PC2) accumulated 89% of total variance (65% and 24%, respectively), and only these two first axes were kept in the analysis. The two LD treatments, LDa and LDd, correspond, respectively, to control flies from the same generations as MD and HD treatments. (B) Ranking of molecules according to their correlation to PC1. (C) Ranking of molecules according to their correlation to PC2.

stresses (Korsloot et al., 2004; Li and Srivastava, 2004). Despite the link between crowding and oxidative stress resistance (Buck et al., 1993; Dudas and Arking, 1995), we found no evidence of clear-cut increased regulation of antioxidant genes, or of *hsp* genes, in larvae reared under crowded conditions (MD and HD). Unlike Sørensen and Loeschcke (2001), Dudas and Arking (1995) also failed to observe increased regulation of HSPs in adults of *D. melanogaster* from their HD conditions. It is possible that regulation of stress genes occurred at different time scales (especially post-transcriptionally; see Bahrndorff et al., 2009; Košťál and Tollarová-Borovanská, 2009), or in other larval stages (i.e. L1 or L2, as we monitored gene expression in L3).

Crowding changes the chemical composition of the nutritional environment, mainly via metabolic waste excreted by the large number of larvae (Botella et al., 1985; Borash et al., 1998). While

this waste is deleterious at high doses, it could be stimulating at low doses, i.e. inducing hormetic effects (Hayes, 2007; Mattson, 2008; Calabrese and Mattson, 2009; Costantini, 2014). We found increasing concentrations of urea in food with increasing larval density. Yet, despite being present in food, urea was not detected in wandering larvae, most probably because this is a non-feeding stage, and urea might have been either metabolized or excreted earlier. Interestingly, we found upregulation of *uro* gene, but only under the MD condition. There are three known urea metabolizing enzymes: arginase in the ornithine–urea cycle, and allantoinase and urate oxidase in the uricolytic pathway. Urate oxidase is coded by the *uro* gene. Even though this gene is known to be present in *D. melanogaster* (Friedman and Baker, 1982), fruit flies are not capable of metabolizing urea (Etienne et al., 2001). Therefore, the upregulation of *uro* under MD conditions might not be directly linked to dietary urea. *uro* is involved in many stress-related pathways, such as exposure to ethanol (Logan-Garbisch et al., 2014) or oxidative stress (Terhzaz et al., 2010). Other studies have also reported an upregulation of *uro* in cold-exposed *Drosophila* adults (Zhang et al., 2011; Boardman et al., 2017); therefore, this gene probably has multiple functions related to stress-tolerance mechanisms.

To evaluate the potential role of urea in enhancing thermotolerance of *D. melanogaster*, we used larvae reared under low density, and fed with urea-supplemented medium. Small doses of urea supplementation, corresponding to the amounts we quantified in the MD treatment, enhanced cold tolerance of the larvae, while high doses of urea were deleterious. These causal changes indicate that dietary accumulation of metabolic waste may directly affect (positively or negatively) stress tolerance. Both heat stress and urea exposure induce protein unfolding (David et al., 1999). The combination of these two protein-denaturing treatments was probably overly cytotoxic, therefore explaining the poor survival of urea-supplemented larvae exposed to high temperature. Conversely, beneficial effects of urea supplementation might have been linked to increased hemolymph osmolarity (Pierce et al., 1999). In particular, amino acids such as proline and alanine, which have been directly linked to *Drosophila* cold tolerance (Olsson et al., 2016; Košťál et al., 2012), showed increased concentrations in flies fed on urea-supplemented media (Pierce et al., 1999). Overall, we consider that the positive effect of urea supplementation is insufficient to explain the large differences in cold tolerance between LD and MD larvae, but it is possible that it partly contributed to the observed effects.

Finally, crowding can directly affect the physiology of the larvae by altering diet quality and causing a scarcity of essential nutrients, leading to mild or more severe nutritional/caloric restriction (Botella et al., 1985). It has been shown that nutritional balance disruption such as yeast deprivation or sugar deprivation can generate large variations in life-history traits (Chippindale et al., 1993; Imasheva et al., 1999; Mair et al., 2005) together with metabolic shifts (Skorupa et al., 2008; Matzkin et al., 2011; Colinet and Renault, 2014). Thus, we performed a quantitative metabolic profiling that compared (i) control LDa versus MD larvae in one generation and (ii) control LDd versus HD larvae in a subsequent generation. The metabolic phenotypes of the two uncrowded controls (LDa and LDd) overlapped, which suggests a consistency of metabolic patterns between generations. We observed, however, a clear discrimination of the three experimental treatments (LD, MD and HD larvae), which indicates that larval crowding generated physiological phenotypes that were dissimilar. This discrimination was mainly characterized by high concentrations of sugars and low amounts of amino acids at higher densities. Interestingly, the second

axis of the PCA, still accounting for 24% of the inertia, only discriminated the MD condition from the two others, with a high content of polyols (xylitol, sorbitol, glycerol phosphate) and fructose in MD larvae. All these compounds could potentially be linked to cold tolerance of larvae (Overgaard et al., 2007; Teets et al., 2012; Colinet et al., 2013; Williams et al., 2014; Košťál et al., 2016). Therefore, our metabolomic results represent further support of the hormesis effect hypothesis, as some variations were only present at intermediate larval density, hence depicting a non-gradual effect of increased crowding on metabolism. Although we can only report correlations between a metabolic profile shift and enhanced thermotolerance, our findings are similar to results from artificial diet manipulation experiments. When fruit flies were fed with reduced amounts of yeasts, an increase in carbohydrate content was observed (Simmons and Bradley, 1997; Skorupa et al., 2008; Matzkin et al., 2011; Galenza et al., 2016). Higher cold tolerance was also detected in these flies (Burger et al., 2007; Andersen et al., 2010; Sisodia and Singh, 2012), as well as in mildly raised ones (Le Bourg, 2013, 2015). Consequently, it is possible that larvae from crowded conditions had to feed on a yeast-limited diet because of competition, leading to overconsumption of carbohydrates, and resulting in stress-resistant phenotypes. At very high larval density, however, the hardening-like effect generated by crowding could be contained by the excessive nutritional stress.

Conclusions

Larval crowding is an important component of the environment in natural populations of *Drosophila* (Bubli et al., 1998). At high larval density, the amount of food available is much reduced and of poor nutritional quality. This condition hampers the ability of larvae to attain the critical body mass needed for successful pupation, thus increasing larval mortality (Bakker, 1962). Our study conclusively showed that the thermotolerance of larvae can strongly vary with larval density. To our knowledge, we have provided here the first record of increased tolerance to cold stress triggered by larval density.

Crowding is a complex stress that results from many constraints such as competition for food resources and intoxication by waste generated by larval metabolism. We found multiple phenotypical and physiological correlates pointing to non-gradual effects of crowding on larvae. We did not succeed in replicating the observation of *hsp70* upregulation in crowding, but we did find interesting patterns of expression of antioxidant genes and *uro*. Metabolic profiles were dependent on crowding intensity, and showed similar patterns to the ones described in fasting or diet alteration experiments, which could explain their convergence regarding cold tolerance. Thermotolerance effects could have also been triggered by exposure to toxic waste and, more specifically, intermediate urea supplementation without crowding improved cold tolerance of *D. melanogaster* larvae. Collectively, these results may indicate a cross-tolerance hormetic effect of mild crowding, although they might also be linked to selection of extreme larvae. Many parameters potentially linked to population density like inter-individual chemical communication (Vijendravarma et al., 2012), food consumption rate (Ireland and Turner, 2006) or even microbial community (Leonardo and Mondor, 2006), remain almost untested in this context, and could be of crucial importance in shaping the effects of crowding.

Acknowledgements

We thank M. Dahirel for invaluable help with statistical analyses and graphics construction as well as insightful comments on an earlier draft. We are also grateful

to the two anonymous reviewers for their pertinent comments on a previous version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: H.Y., H.C.; Methodology: H.Y., H.C.; Formal analysis: H.Y.; Investigation: H.Y., H.C.; Writing - original draft: H.Y.; Writing - review & editing: H.Y., D.R., H.C.; Supervision: D.R., H.C.; Funding acquisition: H.C.

Funding

This study was partly supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE21-0017) and Austrian Science Fund (FWF): I 2604-B25.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.169342.supplemental>

References

- Andersen, L. H., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., Toft, S. and Mayntz, D. (2010). Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **56**, 336-340.
- Arias, L. N., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., Loeschcke, V. and Norry, F. M. (2012). Survival of heat stress with and without heat hardening in *Drosophila melanogaster*: interactions with larval density. *J. Exp. Biol.* **215**, 2220-2225.
- Atkinson, W. D. (1979). A field investigation of larval competition in domestic *Drosophila*. *J. Anim. Ecol.* **48**, 91-102.
- Bahrndorff, S., Mariën, J., Loeschcke, V. and Ellers, J. (2009). Dynamics of heat-induced thermal stress resistance and *hsp70* expression in the springtail, *Orchesella cincta*. *Funct. Ecol.* **23**, 233-239.
- Bakker, K. (1962). An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Neerl. Zool.* **14**, 200-281.
- Baldal, E. A., van der Linde, K., van Alphen, J. J. M., Brakefield, P. M. and Zwaan, B. J. (2005). The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 407-416.
- Bierbaum, T. J., Mueller, L. D. and Ayala, F. J. (1989). Density-dependent evolution of life-history traits in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **43**, 382-392.
- Boardman, L., Mitchell, K. A., Terblanche, J. S. and Sørensen, J. G. (2017). A transcriptomics assessment of oxygen-temperature interactions reveals novel candidate genes underlying variation in thermal tolerance and survival. *J. Insect Physiol.*
- Borash, D. J., Gibbs, A. G., Joshi, A. and Mueller, L. D. (1998). A genetic polymorphism maintained by natural selection in a temporally varying environment. *Am. Nat.* **151**, 148-156.
- Borash, D. J., Teotónio, H., Rose, M. R. and Mueller, L. D. (2000). Density-dependent natural selection in *Drosophila*: correlations between feeding rate, development time and viability. *J. Evol. Biol.* **13**, 181-187.
- Börger, L. and Fryxell, J. (2012). Quantifying individual differences in dispersal using net squared displacement - Oxford Scholarship. In *Dispersal in Ecology and Evolution*, pp. 222-230. Oxford: Oxford University Press.
- Botella, L. M., Moya, A., González, M. C. and Ménsua, J. L. (1985). Larval stop, delayed development and survival in overcrowded cultures of *Drosophila melanogaster*: effect of urea and uric acid. *J. Insect Physiol.* **31**, 179-185.
- Bubli, O. A., Imasheva, A. G. and Loeschcke, V. (1998). Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* **52**, 619-625.
- Buck, S., Nicholson, M., Dudas, S., Wells, R., Force, A., Baker, G. T. and Arking, R. (1993). Larval regulation of adult longevity in a genetically-selected long-lived strain of *Drosophila*. *Heredity* **71**, 23-32.
- Burger, J. M. S., Hwangbo, D. S., Corby-Harris, V. and Promislow, D. E. L. (2007). The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. *Aging Cell* **6**, 63-71.
- Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 91-97.
- Calabrese, E. J. and Mattson, M. P. (ed.) (2009). The hormetic pharmacy: the feature of natural products and mad-made drugs in disease prevention and treatment. In *Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine*, pp. 177-198. New York: Humana Press Inc.
- Chakrabarti, S., Poidevin, M. and Lemaître, B. (2014). The *Drosophila* MAPK p38c regulates oxidative stress and lipid homeostasis in the intestine. *PLoS Genet.* **10**, e1004659.
- Chippindale, A. K., Leroi, A. M., Kim, S. B. and Rose, M. R. (1993). Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *J. Evol. Biol.* **6**, 171-193.

- Colinet, H. and Renault, D.** (2014). Dietary live yeast alters metabolic profiles, protein biosynthesis and thermal stress tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **170**, 6-14.
- Colinet, H., Lee, S. F. and Hoffmann, A.** (2010). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* **277**, 174-185.
- Colinet, H., Larvor, V., Bical, R. and Renault, D.** (2013). Dietary sugars affect cold tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Metabolomics* **9**, 608-622.
- Colinet, H., Renault, D., Javal, M., Berková, P., Šimek, P. and Košťál, V.** (2016). Uncovering the benefits of fluctuating thermal regimes on cold tolerance of *Drosophila* flies by combined metabolomic and lipidomic approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 1736-1745.
- Costantini, D.** (2014). *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology*. Berlin: Springer.
- Costantini, D., Metcalfe, N. B. and Monaghan, P.** (2010). Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol. Lett.* **13**, 1435-1447.
- David, C. L., Pierce, V. A., Aswad, D. W. and Gibbs, A. G.** (1999). The effect of urea exposure on isoaspartyl content and protein l-isoaspartate methyltransferase activity in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **124**, 423-427.
- Dudas, S. P. and Arking, R.** (1995). A coordinate upregulation of antioxidant gene activities is associated with the delayed onset of senescence in a long-lived strain of *Drosophila*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **50A**, B117-B127.
- Etienne, R., Fortunat, K. and Pierce, V.** (2001). Mechanisms of urea tolerance in urea-adapted populations of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **204**, 2699-2707.
- Feder, M. E., Blair, N. and Figueras, H.** (1997). Natural thermal stress and heat-shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae. *Funct. Ecol.* **11**, 90-100.
- Friedman, T. B. and Barker, A. P.** (1982). Purification and partial characterization of urate oxidase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* **12**, 563-570.
- Galenza, A., Hutchinson, J., Campbell, S. D., Hazes, B. and Foley, E.** (2016). Glucose modulates *Drosophila* longevity and immunity independent of the microbiota. *Biology Open* **5**, 165-173.
- Hayes, D. P.** (2007). Nutritional hormesis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**, 147-159.
- Hothorn, T., Bretz, F. and Westfall, P.** (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* **50**, 346-363.
- Imasheva, A. G. and Bubliy, O. A.** (2003). Quantitative variation of four morphological traits in *Drosophila melanogaster* under larval crowding. *Hereditas* **138**, 193-199.
- Imasheva, A. G., Bosenko, D. V. and Bubli, O. A.** (1999). Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* **82**, 187-192.
- Ireland, S. and Turner, B.** (2006). The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci. Int.* **159**, 175-181.
- Kolss, M., Vijendravarma, R. K., Schwaller, G. and Kawecki, T. J.** (2009). Life-history consequences of adaptation to larval nutritional stress in *Drosophila*. *Evolution* **63**, 2389-2401.
- Korsloot, A., van Gestel, C. A. M. and van Straalen, N. M.** (2004). *Environmental Stress and Cellular Response in Arthropods*, 1st edn. Boca Raton, FA: CRC Press.
- Košťál, V. and Tollarová-Borovanská, M.** (2009). The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS ONE* **4**, e4546.
- Košťál, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Cimlová, J. and Štětina, T.** (2012). Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3270-3274.
- Košťál, V., Korblová, J., Poupardin, R., Moos, M. and Šimek, P.** (2016). Arginine and proline applied as food additives stimulate high freeze tolerance in larvae of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **219**, 2358-2367.
- Kovács, L. and Csermely, P.** (2007). Crowding stress. In *Encyclopedia of Stress*, 2nd edn (ed. G. Fink), pp. 669-672. New York: Academic Press.
- Kültz, D.** (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 225-257.
- Le Bourg, É.** (2013). Fasting can protect young and middle-aged *Drosophila melanogaster* flies against a severe cold stress. *Biogerontology* **14**, 513-529.
- Le Bourg, É.** (2015). Fasting and other mild stresses with hormetic effects in *Drosophila melanogaster* can additively increase resistance to cold. *Biogerontology* **16**, 517-527.
- Leonardo, T. E. and Mondor, E. B.** (2006). Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow. *Proc. R. Soc. B* **273**, 1079-1084.
- Li, Z. and Srivastava, P.** (2004). Heat-shock proteins. *Current Protocols in Immunology* **58**, 1T.1.1-A.1T.6. p
- Lints, F. A. and Lints, C. V.** (1969). Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids I. Preimaginal population density. *Exp. Gerontol.* **4**, 231-244.
- Loeschcke, V., Krebs, R. A. and Barker, J. S. F.** (1994). Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. *Biol. J. Linn. Soc.* **52**, 83-92.
- Logan-Garbisch, T., Bortolazzo, A., Luu, P., Ford, A., Do, D., Khodabakhshi, P. and French, R. L.** (2014). Developmental ethanol exposure leads to dysregulation of lipid metabolism and oxidative stress in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* **5**, 49-59.
- Mair, W., Piper, M. D. W. and Partridge, L.** (2005). Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **3**, e223.
- Mattson, M. P.** (2008). Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.* **7**, 1-7.
- Matzkin, L. M., Johnson, S., Paight, C., Bozinovic, G. and Markow, T. A.** (2011). Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse *Drosophila*. *J. Nutr.* **141**, 1127-1133.
- Miller, R. S. and Thomas, J. L.** (1958). The effects of larval crowding and body size on the longevity of adult *Drosophila melanogaster*. *Ecology* **39**, 118-125.
- Moghadam, N. N., Holmstrup, M., Manenti, T. and Loeschcke, V.** (2015). Phospholipid fatty acid composition linking larval-density to lifespan of adult *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **72**, 177-183.
- Mueller, L. D., Graves, J. L. and Rose, M. R.** (1993). Interactions between density-dependent and age-specific selection in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* **7**, 469-479.
- Nunney, L.** (1990). *Drosophila* on oranges: colonization, competition, and coexistence. *Ecology* **71**, 1904-1915.
- Olsson, T., MacMillan, H. A., Nyberg, N., Stærk, D., Malmendal, A. and Overgaard, J.** (2016). Hemolymph metabolites and osmolality are tightly linked to cold tolerance of *Drosophila* species: a comparative study. *J. Exp. Biol.* **219**, 2504-2513.
- Oudman, L., Kamping, A. and van Delden, W.** (1988). Body size and survival at high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Info. Serv.* **67**, 63.
- Overgaard, J., Sørensen, J. G., Petersen, S. O., Loeschcke, V. and Holmstrup, M.** (2006). Reorganization of membrane lipids during fast and slow cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Entomol.* **31**, 328-335.
- Overgaard, J., Malmendal, A., Sørensen, J. G., Bundy, J. G., Loeschcke, V., Nielsen, N. C. and Holmstrup, M.** (2007). Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **53**, 1218-1232.
- Pfaffi, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Pierce, V. A., Mueller, L. D. and Gibbs, A. G.** (1999). Osmoregulation in *Drosophila melanogaster* selected for urea tolerance. *J. Exp. Biol.* **202**, 2349-2358.
- Prout, T. and McChesney, F.** (1985). Competition among immatures affects their adult fertility: population dynamics. *Am. Nat.* **126**, 521-558.
- Quintana, A. and Prevosti, A.** (1990). Genetic and environmental factors in the resistance of *Drosophila subobscura* adults to high temperature shock. *Theor. Appl. Genet.* **80**, 847-851.
- Sarangi, M., Nagarajan, A., Dey, S., Bose, J. and Joshi, A.** (2016). Evolution of increased larval competitive ability in *Drosophila melanogaster* without increased larval feeding rate. *J. Genet.* **95**, 491-503.
- Scheiring, J. F., Davis, D. G., Banasinghe, A. and Teare, C. A.** (1984). Effects of larval crowding on life history parameters in *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera:Drosophilidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **77**, 329-332.
- Shnoi, V. N., Ali, S. Z. and Prasad, N. G.** (2016). Evolution of increased adult longevity in *Drosophila melanogaster* populations selected for adaptation to larval crowding. *J. Evol. Biol.* **29**, 407-417.
- Shreve, S. M., Yi, S.-X. and Lee, R. E.** (2007). Increased dietary cholesterol enhances cold tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Cryo. Lett.* **28**, 33-37.
- Simmons, F. H. and Bradley, T. J.** (1997). An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **43**, 779-788.
- Sisodia, S. and Singh, B. N.** (2012). Experimental evidence for nutrition regulated stress resistance in *Drosophila ananassae*. *PLoS ONE* **7**, e46131.
- Skorupa, D. A., Dervisevendic, A., Zwiener, J. and Pletcher, S. D.** (2008). Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **7**, 478-490.
- Somero, G. N. and Yancey, P. H.** (1997). Osmolytes and cell-volume regulation: physiological and evolutionary principles. In *Comprehensive Physiology*, pp. 441-484. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Sørensen, J. G. and Loeschcke, V.** (2001). Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *J. Insect Physiol.* **47**, 1301-1307.
- Sulmon, C., van Baaren, J., Cabello-Hurtado, F., Gouesbet, G., Hennion, F., Mony, C., Renault, D., Bormans, M., El Amrani, A., Wiegand, C. et al.** (2015). Abiotic stressors and stress responses: What commonalities appear between species across biological organization levels? *Environ. Pollut.* **202**, 66-77.
- Teets, N. M., Peyton, J. T., Ragland, G. J., Colinet, H., Renault, D., Hahn, D. A., Denlinger, D. L.** (2012). Combined transcriptomic and metabolomic approach uncovers molecular mechanisms of cold tolerance in a temperate flesh fly. *Physiol. Genomics* **44**, 764-777.
- Tennessen, J. M., Barry, W. E., Cox, J. and Thummel, C. S.** (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods* **68**, 105-115.

- Terhzaz, S., Finlayson, A. J., Stirrat, L., Yang, J., Tricoire, H., Woods, D. J., Dow, J. A. T. and Davies, S.-A.** (2010). Cell-specific inositol 1,4,5 trisphosphate 3-kinase mediates epithelial cell apoptosis in response to oxidative stress in *Drosophila*. *Cellular Signaling* **22**, 737-748.
- Vijendravarma, R. K., Narasimha, S. and Kawecki, T. J.** (2012). Evolution of foraging behaviour in response to chronic malnutrition in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. B* **279**, 3540-3546.
- Warren, M., McGeoch, M. A., Nicolson, S. W. and Chown, S. L.** (2006). Body size patterns in *Drosophila* inhabiting a mesocosm: interactive effects of spatial variation in temperature and abundance. *Oecologia* **149**, 245-255.
- Wertheim, B., Marchais, J., Vet, L. E. M. and Dicke, M.** (2002). Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms. *Ecol. Entomol.* **27**, 608-617.
- Williams, C. M., Watanabe, M., Guarracino, M. R., Ferraro, M. B., Edison, A. S., Morgan, T. J., Boroujerdi, A. F. B. and Hahn, D. A.** (2014). Cold adaptation shapes the robustness of metabolic networks in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **68**, 3505-3523.
- Yancey, P. H. and Somero, G. N.** (1980). Methylamine osmoregulatory solutes of elasmobranch fishes counteract urea inhibition of enzymes. *J. Exp. Zool.* **212**, 205-213.
- Zhang, J., Marshall, K. E., Westwood, J. T., Clark, M. S. and Sinclair, B. J.** (2011). Divergent transcriptomic responses to repeated and single cold exposures in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **214**, 4021-4029.
- Zwaan, B., Bijlsma, R. and Hoekstra, R.** (1991). On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity* **66**, 29-39.

Supplementary material

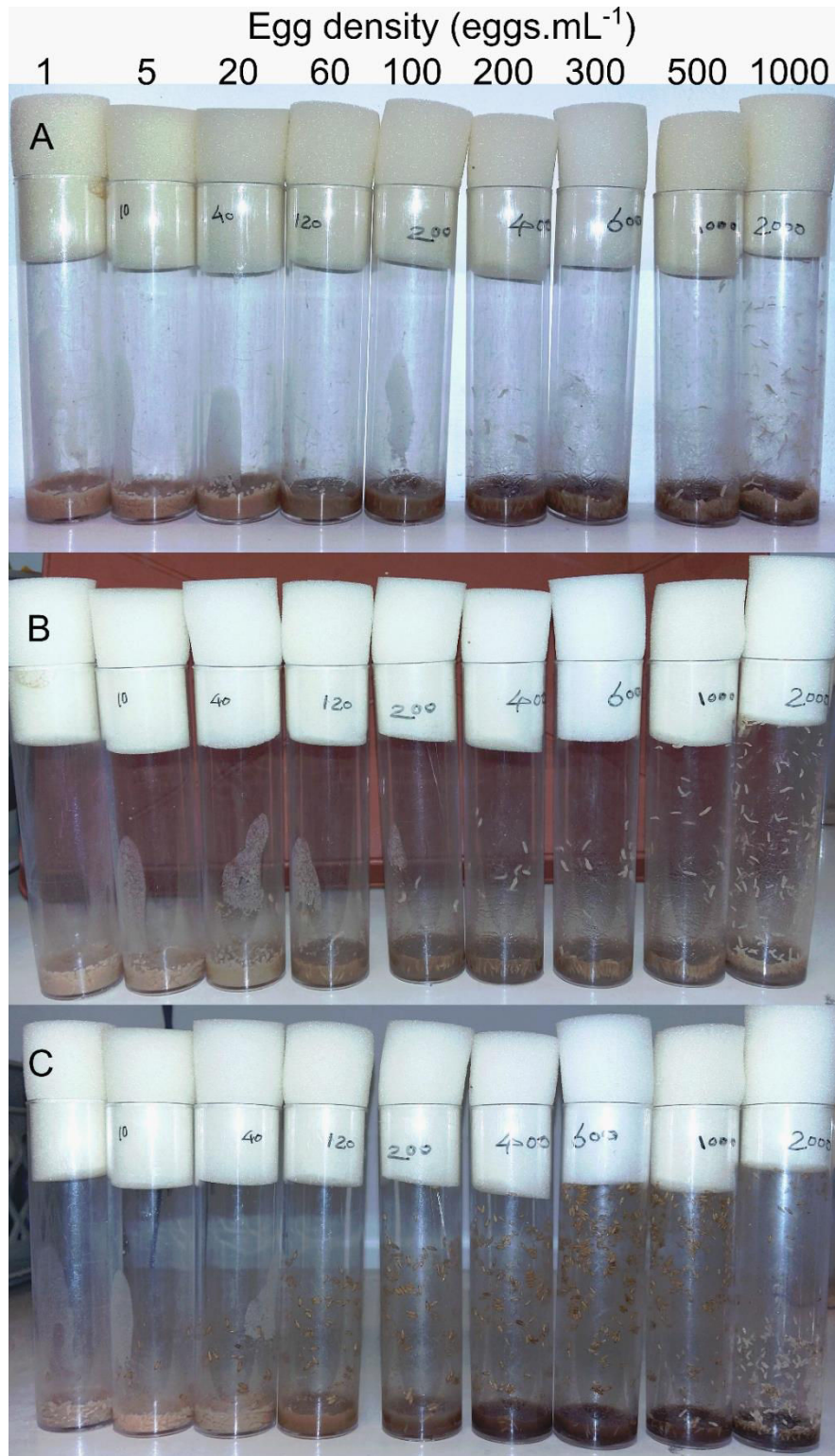


Figure S1: Pictures of selected vials from all densities treatments at time = (A) 114h; (B) 120h; and (C) 195h after egg laying.

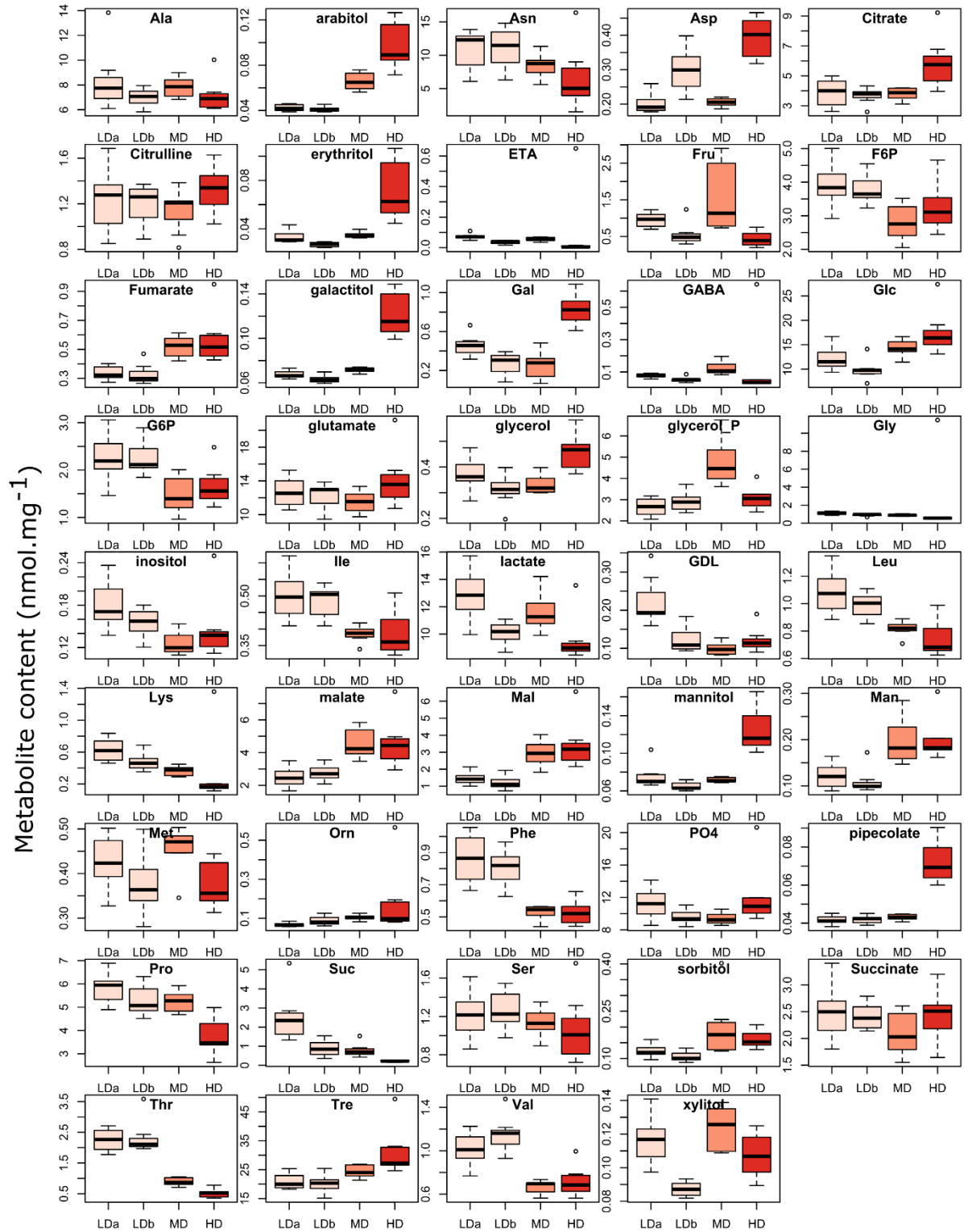


Figure S2: Metabolites contents in *D. melanogaster* larvae from all three density treatments, expressed by milligram of dry mass. Metabolites are ranked in alphabetical order.

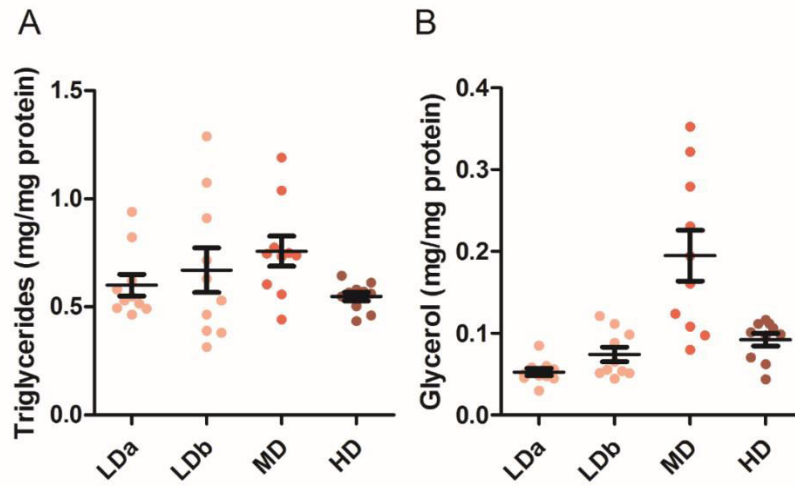


Figure S3: (A) TAG content in larvae reared in LD, MD or HD density conditions, and expressed as mg per mg of protein. (B) glycerol content in larvae reared in LD, MD or HD density conditions, and expressed as mg per mg of protein. Dots: raw individual measurements (N = 10). Black bar: mean. Error bars show 95% confidence intervals.

Table S1: Table of larval density conditions used for *Drosophila* studies in literature.

Authors	Year	Larval density range (individuals. mL food ⁻¹)		Number of tested densities	Accuracy of density treatment
		Minimal	Maximal		
This study		1	1000	9	+++
Baldal et al.	2005	2	28	3	+++
Barker and Podger	1970	4	64	6	+++
Bierbaum and Mueller	1989	4	40	3	+++
Borash et al.	1998	10	200	2	+
Bubli et al.	1998	3	40	2	++
Buck et al.	1993	2	12	2	+
Dudas and Arking	1995	2	20	2	+
Horvath and Kalinka	2016	5	44	3	+++
Imasheva and Bubliy	2003	5	50	3	+++
Joshi and Mueller	1996	4	200	2	+
Kloss et al.	2009	-	25	1	+
Lewontin	1955	0	10	6	++
Lints and Lints	1969	1	87	8	++
Luckinbill and Clare	1985	2	24	2	+
Miller and Thomas	1958	1	20	7	+++
Moghadam et al.	2015	1	14	2	+++
Mueller and Sweet	1986	5	60	2	+
Oudman et al.	1988	5	30	3	+++
Prout and McChesney	1985	0	76	10	++
Qintana and Prevosti	1990	4	12	2	+++
Santos et al.	1994	20	80	5	+++
Sarangi et al.	2016	12	600	3	+++
Scheiring et al.	1984	2	22	9	+
Schenoi et al.	2015	12	120	4	+++
Shiotsugu et al.	1997	10	100	2	+
Zwaan et al.	1991	6	44	4	+++
Mean (± sd)		4.9 (± 4.7)	77.8 (± 118.1)		

Articles were selected by using “Larval density”, “Crowding” and “Overcrowding”, as keywords associated to “Drosophila” in Google Scholar. We only kept studies where individuals were actually counted, and discarded all studies with densities expressed as a number of females allowed to lay eggs on a given period of time. Values of density are rounded to the nearest integer. Mean and standard deviation values exclude the present study. “+” indicates studies with

unclear/lacking/imprecise information about number of individuals or about amount of food; “++” indicates study were authors acknowledged having imprecise counting; “+++” indicates studies where all information was present to properly calculate density.

References for table S1

- Baldal, E. A., van der Linde, K., van Alphen, J. J. M., Brakefield, P. M. and Zwaan, B. J.** (2005). The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**, 407–416.
- Barker, J. S. F.** (1973). Adult population density, fecundity and productivity in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Oecologia* **11**, 83–92.
- Bierbaum, T. J., Mueller, L. D. and Ayala, F. J.** (1989). Density-dependent evolution of life-history traits in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **43**, 382–392.
- Borash, D. J., Gibbs, A. G., Joshi, A. and Mueller, L. D.** (1998). A genetic polymorphism maintained by natural selection in a temporally varying environment. *Am. Nat.* **151**, 148–156.
- Bubli, O. A., Imasheva, A. G. and Loeschke, V.** (1998). Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* **52**, 619–625.
- Buck, S., Nicholson, M., Dudas, S., Wells, R., Force, A., Baker, G. T. and Arking, R.** (1993). Larval regulation of adult longevity in a genetically-selected long-lived strain of *Drosophila*. *Heredity* **71**, 23–32.
- Dudas, S. P. and Arking, R.** (1995). A coordinate upregulation of antioxidant gene activities is associated with the delayed onset of senescence in a long-lived strain of *Drosophila*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50A**, B117–B127.
- Horváth, B. and Kalinka, A. T.** (2016). Effects of larval crowding on quantitative variation for development time and viability in *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol* **6**, 8460–8473.
- Imasheva, A. G. and Bubliy, O. A.** (2003). Quantitative variation of four morphological traits in *Drosophila melanogaster* under larval crowding. *Hereditas* **138**, 193–199.
- Joshi, A. and Mueller, L. D.** (1996). Density-dependent natural selection in *Drosophila*: Trade-offs between larval food acquisition and utilization. *Evol Ecol* **10**, 463–474.
- Kolss, M., Vijendravarma, R. K., Schwaller, G. and Kawecki, T. J.** (2009). Life-history consequences of adaptation to larval nutritional stress in *Drosophila*. *Evolution* **63**, 2389–2401.
- Lewontin, R. C.** (1955). The effects of population density and composition on viability in *Drosophila Melanogaster*. *Evolution* **9**, 27–41.
- Lints, F. A. and Lints, C. V.** (1969). Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids I. Preimaginal population density. *Experimental Gerontology* **4**, 231–244.
- Luckinbill, L. S. and Clare, M. J.** (1985). Selection for life span in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **55**, 9–18.
- Miller, R. S. and Thomas, J. L.** (1958). The effects of larval crowding and body size on the longevity of adult *Drosophila Melanogaster*. *Ecology* **39**, 118–125.
- Moghadam, N. N., Holmstrup, M., Manenti, T. and Loeschke, V.** (2015). Phospholipid fatty acid composition linking larval-density to lifespan of adult *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* **72**, 177–183.

- Mueller, L. D., Gonzalez-Candelas, F. and Sweet, V. F.** (1991). Components of density-dependent population dynamics: models and tests with *Drosophila*. *The American Naturalist* **137**, 457–475.
- Oudman, L., Kamping, A., and van Delden, W.** (1988). Body size and survival at high temperature in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* **67**, 63.
- Prout, T. and McChesney, F.** (1985). Competition among immatures affects their adult fertility: population dynamics. *The American Naturalist* **126**, 521–558.
- Quintana, A. and Prevosti, A.** (1990). Genetic and environmental factors in the resistance of *Drosophila subobscura* adults to high temperature shock. *Theoret. Appl. Genetics* **80**, 847–851.
- Santos, M., Fowler, K. and Partridge, L.** (1994). Gene-environment interaction for body size and larval density in *Drosophila melanogaster*: an investigation of effects on development time, thorax length and adult sex ratio. *Heredity* **72**, 515–521.
- Sarangi, M., Nagarajan, A., Dey, S., Bose, J. and Joshi, A.** (2016). Evolution of increased larval competitive ability in *Drosophila melanogaster* without increased larval feeding rate. *J Genet* **95**, 491–503.
- Scheiring, J. F., Davis, D. G., Banasinghe, A. and Teare, C. A.** (1984). Effects of larval crowding on life history parameters in *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera:Drosophilidae). *Entomological news*.
- Shenoi, V. N., Ali, S. Z. and Prasad, N. G.** (2016). Evolution of increased adult longevity in *Drosophila melanogaster* populations selected for adaptation to larval crowding. *J. Evol. Biol.* **29**, 407–417.
- Shiotsugu, J., Leroi, A. M., Yashiro, H., Rose, M. R. and Mueller, L. D.** (1997). the symmetry of correlated selection responses in adaptive evolution: an experimental study using *Drosophila*. *Evolution* **51**, 163–172.
- Zwaan, B., Bijlsma, R. and Hoekstra, R.** (1991). On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity* **66**, 29–39.

Table S2: List of primer sequences used in qPCR tests.

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Fragment length (bp)	Reference
<i>EF1_FOR</i>	GCGTGGGTTTGTGATCAGTT	125	Ponton et al. (2011)
<i>EF1_REV</i>	GATCTTCTCCTTGCCCATCC		
<i>Rpl32_FOR</i>	ATGCTAAGCTGTCGCACAAATG	107	Ponton et al. (2011)
<i>Ppl32_REV</i>	GTTCGATCCGTAACCGATGT		
<i>RpS20_FOR</i>	CCGCATCACCTGACATCC	134	Colinet et al. (2010)
<i>RpS20_REV</i>	TGGTGATGCCAAGGGTCTTG		
<i>Hsp22_FOR</i>	GCCTCTCCTCGCCCTTTCAC	66	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp22_REV</i>	TCCTCGGTAGCGCCACACTC		
<i>Hsp23_FOR</i>	GGTGCCCTTCTATGAGCCCTACTAC	153	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp23_REV</i>	CCATCCTTCCGATTTTCGACAC		
<i>Hsp26_FOR</i>	GTCACATCATGCGCCACTTTG	52	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp26_REV</i>	TTGTAGCCATCGGGAACCTTGTAG		
<i>Hsp27_FOR</i>	GGCCACCACAATCAAATGTCAC	171	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp27_REV</i>	CTCCTCGTGCTCCCTCTACC		
<i>Hsp40_FOR</i>	GAGATCATCAAGCCCACCACAAC	112	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp40_REV</i>	CGGAAACTTAATGTCGAAGGAGAC		
<i>Hsp60_FOR</i>	ACATCTCGCCGACTTCATCAACTC	66	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp60_REV</i>	GGAGGAGGGCATCTTGGAACTC		
<i>Hsp67_FOR</i>	TGGATGAACCCACACCCAATC	89	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp67_REV</i>	CGAGGCAACGGGCACTTC		
<i>Hsp68_FOR</i>	GAAGGCACTCAAGGACGCTAAAATG	88	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp68_REV</i>	CTGAACCTTGGGAATACGAGTG		
<i>Hsp70_FOR</i>	TCGATGGTACTGACCAAGATGAAGG	98	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp70_REV</i>	GAGTCGTTGAAGTAGGCTGGAAGT		
<i>Hsc70-1_FOR</i>	TGCTGGATGTCACTCTCTGTCTC	87	Colinet et al. (2010)
<i>Hsc70-1_REV</i>	TGGGTATGGTGGTGTTCCTCTTAATC		
<i>Hsp83_FOR</i>	GGACAAGGATGCCAAGAAGAAGAAG	150	Colinet et al. (2010)
<i>Hsp83_REV</i>	CAGTCGTTGGTCAGGGATTTGTAG		
<i>Stv_FOR</i>	TCATCAATGCCCACAAGGAGATAC	314	Colinet and Hoffmann (2011)
<i>Stv_REV</i>	GTTTAGTGGCGTCCGGTCTGTTG		
<i>Cat_FOR</i>	GAATTCTCGACGCAGTCACA	272	Logan-Garbish et al. (2014)
<i>Cat_REV</i>	CTGCAGCAGGATAGGTCTC		
<i>GS_FOR</i>	AGTTCACGGCCAATCTGTTC	167	Logan-Garbish et al. (2014)
<i>GS_REV</i>	ATCCTGACCACGATCCTCAC		
<i>uro_FOR</i>	CGACTTCAGCTCCATTGACA	239	Logan-Garbish et al. (2014)
<i>uro_REV</i>	AATCCACCACGGTGCTAAAG		
<i>Sod_FOR</i>	TTGCCATACGGATTGAAGTG	189	Logan-Garbish et al. (2014)
<i>Sod_REV</i>	CGAACAGGAGGTGAGAATCC		

Article 4 - Competition for resource affects environmental microbial communities without altering gut microbiota in *Drosophila melanogaster*

We remarked in the article 3 that urea accumulated in the food but not in larvae during larval crowding. From this simple observation emerged two questions:

- 1) Why is there no urea in larvae but so much in food? Are there other metabolic wastes occurring in this situation?
- 2) Are the microorganisms (both outside and inside larvae) also affected by the changes in food composition?

We investigated these questions by rearing larvae at contrasted densities, and after development, sampling food and larvae for metabolic wastes measurements (uric acid, ammonia) and bacterial community sequencing. We supposed that, like urea, ammonia or uric acid would accumulate in food especially under high larval density. We assumed crowding-induced nutritional alteration would affect phenotypes of individuals but also their surroundings microorganisms. We expected environmental bacterial communities in food to differ significantly according to larval density, and because the larvae feed on this substrate, we also expected their gut microbiota to show concomitant community changes.

Main findings:

- 1) We found uric acid and ammonia, but with surprising distribution. While larvae were almost free of ammonia and accumulated high amounts of uric acid, food from medium and high densities showed important ammonia amounts and no uric acid.
- 2) External bacterial communities showed clear-cut changes in their species composition and diversity according to larval density.
- 3) Changes in environmental bacteria communities were likely driven by metabolic wastes, as they represent a large nitrogen resource, and act as strong environmental filter (Winans et al., 2017).
- 4) Gut microbiota was surprisingly stable to external changes, suggesting active control of microbiota is realized by larvae.
- 5) Dietary supplementation of metabolic wastes in uncrowded cultures generated few life-history traits changes, suggesting food toxicity was not the main stressor during crowding.

Competition for resource affects environmental microbial communities without altering gut microbiota in *Drosophila melanogaster*

Y. Henry¹, P. Tarapacki, H. Colinet¹

¹ECOBIO - UMR 6553, Univ Rennes 1, CNRS, Rennes, France

*Corresponding author: Hervé Colinet, UMR CNRS 6553 Ecobio, Université de Rennes1, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes, France.

Email: herve.colinet@univ-rennes1.fr

Abstract

Larval crowding represents a complex stressful situation arising from interindividual competition for time- and space-limited resources. Phenotypical changes associated with such stress are numerous in *Drosophila* flies. The foraging of a large numbers of individuals may alter chemical and bacterial composition of food, and this may in turn affect individual's traits. Here, we used *Drosophila melanogaster* to explore these assumptions. First, we used a wide larval density gradient to evidence the impact of crowding on phenotypical traits (development, viability, morphology, pupation behavior). We confirmed that high densities increased development time and pupation height, and decreased viability and mass. Next, we measured concentrations in common metabolic wastes (ammonia and uric acid) and characterized bacterial communities, both in food and in larvae, for three contrasted larval densities (low, medium and high). Ammonia concentration increased in food from medium and high larval densities, but remained low in larvae regardless of the larval density. Uric acid level did not accumulate in food but was detected in larvae, particularly at low density. Surprisingly, composition of bacterial community remained stable in gut of larvae whatever their rearing density. In contrast, it drastically changed with larval density in the food substrate. Using dietary supplementation of metabolic wastes, we tested whether these products were responsible for observed phenotypes. Although development was slightly delayed by ammonia, other traits were not significantly affected. Overall these results indicate that crowding deeply affects individual's phenotype, but also their abiotic and biotic surroundings. Data suggest that environmental bacteria community is highly flexible and likely adapt to poor nutritional conditions resulting from crowding. We discuss the putative role of bacteria as scavengers of larvae's metabolic wastes.

Keywords: larval density, crowding, microbiota, metabolic wastes, uric acid, ammonia

Introduction

Scramble competition may appear in insects feeding on discrete, spatially restricted and ephemeral resources such as carrion, weeds or rotting fruits (Crawley and Gillman, 1989; Ireland and Turner, 2006; Nunney, 1990). These limited resource patches are colonized by opportunistic species as soon as they become available, and population density may rapidly reach a crowded situation (Atkinson, 1979). Consequences of crowding are multiple. High individual densities do not only generate a quantitative food shortage; foraging and excretion of conspecifics also degrade the nutritional quality of the resource supply (Botella et al., 1985). In *Drosophila*, this typically results in marked phenotypic effects such as reduced body mass and slower development (Borash et al., 2000; Kolss et al., 2009; Lints and Lints, 1969; Scheiring et al., 1984). Curiously, moderate level of crowding can also be beneficial to flies, for instance by promoting tolerance to stressors such as starvation, toxic wastes, or thermal stress (Borash and Ho, 2001; Henry et al., 2018; Shiotsugu et al., 1997; Sørensen and Loeschcke, 2001). It results that crowding applies a significant selection pressure that can have evolutionary consequences on populations experiencing large densities in ephemeral resources (Horváth and Kalinka, 2016; Sarangi et al., 2016).

Two main factors are supposed to underlie crowding effects in flies: food deprivation and intoxication due to ingestion of metabolic wastes. In a recent study, Klepsatel et al. (2018) showed that effects of increased larval density on life-history traits were likely driven by decreased yeast availability in food. They showed that yeast-poor diets without crowding triggered equivalent changes in size, energy reserves and lifespan as those observed in flies submitted to high larval density. Previous studies also indicated that the accumulation of nitrogenous wastes, resulting from excretion (urea, ammonia, uric acid), may also influence *Drosophila* development and life-history traits (Botella et al., 1985; Joshi et al., 1996). However, it remains unclear which nitrogenous wastes are actually excreted by larvae: uric acid, urea or ammonia (Borash et al., 1998; Botella et al., 1985; Etienne et al., 2001; Henry et al., 2018). Regardless of the exact compounds, multiple lines of evidence suggest that exposure to nitrogenous wastes imposes a strong selective force leading to the evolution of resistant genotypes (Borash et al., 2000). The combination of both quantitative and qualitative food alterations thus remains a reasonable hypothesis to explain phenotypic effects generated by crowding.

The alteration of nutritional medium by the action of larval foraging is clearly impacting flies, but is also likely to affect microorganism's communities colonizing the food, such as bacteria and yeasts (Chandler et al., 2012). *Drosophila* individuals, whether at the larval or adult stage, establish mutualistic relationships with these microorganisms (Erkosar et al., 2013). Contrary to obligate symbiosis found in other insect species such as stinkbugs or weevils (Anbutsu et al., 2017; Tada et al., 2011), host-bacteria interactions are facultative in *Drosophila*. This explains the large variability

in microbiota composition observed according to environmental parameters or artificial rearing conditions in flies (Bing et al., 2018; Erkosar and Leulier, 2014; Staubach et al., 2013; Téfrit et al., 2018). The transient nature of this relationship implies a constant need for replenishment via the feeding (Blum et al., 2013). However, this view was recently challenged by the observation of stable and resilient associations, even in varying environment (Jehrke et al., 2018; Pais et al., 2018). Indeed, in nature, flies' gut microbiota is not perfectly matching environment, and taxa are often largely over- or under-represented in the digestive tract compared to the environment, suggesting an active control by the host (Martinson et al., 2017). This is not surprising since best cooperators are likely to be favored over generations and co-adapt toward a maximization of holobiont's fitness (Soen, 2014). In this context, one can wonder to what extent crowding and its side-effects may alter the environmental microbial community as well as flies' gut microbiota. Life-history traits such as lifespan, morphology or development are under the influence of gut microbiota abundance and diversity (Brummel et al., 2004; Ryu et al., 2008; Shin et al., 2011; Wong et al., 2014). In addition, microbiota-related effects are generally dependent on nutrient concentration in the medium (Bing et al., 2018; Matos et al., 2017; Storelli et al., 2011; Yamada et al., 2015), which may be severely reduced during crowding. Considering the myriad of effects that gut microbiota has on phenotypical traits of *D. melanogaster* (Douglas, 2018), it is worth investigating whether effects of crowding may be concurrently associated with microbial changes in both host and food. Larval crowding is an ecologically relevant and naturally occurring situation and hence it represents a great system to explore host-bacteria-environment interactions.

In this study, we investigated the phenotypical consequences of crowding by using an artificial larval density gradient spanning from very low density (isolated individuals) to overcrowded condition. Based on the data resulting from these phenotypic analyses, we selected three contrasted densities in which we sampled individuals (L3 larvae) and food substrate. In all these samples, we measured ammonia and uric acid concentration, and we sequenced bacterial community based on V3/V4 16S regions. We assumed crowding-induced nutritional alteration would affect phenotypes of individuals but also their surroundings microorganisms. We expected environmental bacterial communities in food to differ significantly according to larval density, and because the larvae feed on this substrate, we also expected their gut microbiota to show concomitant community changes. We supposed that, like urea, ammonia or uric acid would accumulate in food especially under high larval density. Finally, we tested whether supplementation of ammonia and/or urea in uncrowded conditions would result in similar phenotypic effects as under crowding.

Material and methods

Fly stocks and rearing medium

We conducted the experiments on an outbred laboratory population of *D. melanogaster* derived from wild individuals collected in September 2015 in Brittany (France). Fly stocks were maintained at 25°C (12L: 12D) on standard fly medium comprising inactive brewer yeast (MP Bio 0290331205, MP Bio, 80 g.L⁻¹), sucrose (50 g.L⁻¹), agar (Sigma-Aldrich A1296, 10 g.L⁻¹) and supplemented with Nipagin (Sigma-Aldrich H5501; 10% 8 mL.L⁻¹). These conditions were also used for rearing of flies in following experiments. *Wolbachia* symbionts were previously eliminated from the population by using tetracycline treatment (Sigma-Aldrich T7660, 50 µg.L⁻¹) for three generations. Effectiveness of the procedure was confirmed by PCR with *wsp* and *wspB* primers (Teixeira et al., 2008).

Larval density

Before all the experiments, we allowed adult flies from rearing stocks to lay eggs for <12 h on standard food supplemented with extra agar (15 g.L⁻¹) and food coloring. Using a binocular microscope, eggs were delicately collected with a paint brush, counted, and then transferred into new vials. Vials (50 mL; d = 23 mm) were precisely filled with 2.0 mL of standard food, in order to achieve all the desired larval density treatments (see below).

Effects of larval crowding

In a first experiment, we generated a broad range of larval densities: 1, 5, 20, 60, 100, 200, 300, 500, and 1000 eggs per mL of food (see Fig. S1). To generate these nine density treatments, a total of 300, 300, 400, 480, 800, 1600, 2400, 4000, and 8000 eggs were counted and deposited in 150, 30, 10, 4, 4, 4, 4 and 4 replicated vials respectively, each with 2 mL of food.

1) Development, phenotypes and behaviors

During development, pupation and adult emergence were checked twice a day to estimate developmental durations (*i.e.* time to pupation and to emergence). Emerged adults were immediately removed from their tubes and transferred to new vials containing clean food. Viability was calculated based on the total number of emerged adults at the end of the experiment over the total number of deposited eggs. Adult fresh and dry masses were individually measured for both sexes from 30 randomly collected individuals per density (3-days-old adults) using a micro-balance (Mettler Toledo UMX2, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland; accurate 1 µg). Dry mass was measured after individuals were dried for at least one week in oven at 60°C. Pupation height was

measured on all vials from all densities using an electronic caliper. Because of very large number of pupae, measurements were only performed on half of the pupae for d200 and d300.

2) Metabolic wastes

We selected three densities showing contrasted phenotypes and referred as LD (low density; d5), MD (medium density; d60) and HD (high density; d300). For these three densities, both ammonia and uric acid were measured in “wandering” instar L3 larvae and in the food that sustained their development. Samples were collected, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

Ammonia measurements were performed using Ammonia Assay Kit (Sigma-Aldrich, AA100) and following manufacturer's instructions. Ten biological replicates of 10 larvae were used for each of the three densities. Samples were weighted using a microbalance. Food samples were adjusted to 50 µg. Samples were homogenized in 250 µL (larvae) or 500 µL (food) of PBS with two tungsten beads using a bead beating apparatus (20 Hz, 2 min). After dilutions when necessary, colorimetric measurements were realized with microplate reader (VersaMax Molecular Devices, San José, CA, USA) at 340 nm.

Uric acid measurements were performed using Urea assay kit (Sigma-Aldrich, MAK077) and following manufacturer's instructions. Eight biological replicates of 10 larvae were used for each of the three densities. Samples were weighted using a microbalance. Food samples were adjusted to 50 µg. Samples were homogenized in 250 µL (larvae) or 500 µL (food) of PBS with two tungsten beads using a bead beating apparatus (20 Hz, 2 min). After dilutions when necessary, fluorometric measurements were realized with microplate reader (SAFAS Monaco Xenius XC, Monaco) set up at 531 nm (emission) and 570 nm (excitation). Quantification was obtained by running serial dilution of uric acid standard. During all these experiments, samples were quickly processed and kept on ice to avoid degradation.

3) Microbiota composition

For LD, MD and HD flies, the bacterial composition of “wandering” instar L3 larvae and of food that sustained their development was characterized using 16S Illumina MiSeq sequencing. Samples were collected in autoclaved tubes with sterile tools, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. To remove external bacteria in larvae, pools of 10 individuals were surface-sterilized with successive baths of 2.7% hypochlorite for two minutes, 70% ethanol for two minutes, and rinsed twice in autoclaved miliQ water. DNA extraction was performed in six independent replicates using FastDNA spin kit (MP Biomedicals) according to manufacturer's instructions. We used PCRs to amplify V3/V4 16S RNA regions with universal bacterial primers: forward (5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG-3'), and

reverse (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3') with adapters for MiSeq (François et al., 2016). Thirty thermal cycles at 65°C annealing temperature were performed. The PCR products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge (Illumina, San-Diego, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

Metabolic wastes supplementation

To investigate phenotypic effects due to metabolic wastes *per se* in non-crowding situation (*i.e.* without nutrient depletion and intense interindividual interactions), we designed a second experimental setup that is illustrated in Fig. S2. In essence, larvae were reared under low larval density but with high amounts of waste products. Of the three putative nitrogenous wastes excreted by *Drosophila*, only ammonia and urea accumulate substantially in food under crowding situation; consequently, only these two molecules were supplemented in food using nominal concentrations that were experimentally found in HD: 1.2 mg.mL⁻¹ for ammonia (Merck Millipore, 105432) (see results section), and 5 mg. mL⁻¹ for urea (PanReac, PA6ACS) (see Henry et al., 2018). The experimental design included four treatments to compare: *Co* (control, no supplementation), *Ur* (urea supplementation), *Am* (ammonia supplementation), *UrAm* (urea and ammonia supplementation) (see Fig. S2). For all treatments, eggs were deposited in LD situation (5 eggs.mL⁻¹, N=6 vials). Development duration, viability and pupation height were measured as previously described.

Data analysis

In the density gradient experiment, development duration as well as ammonia and urea contents were analyzed using one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey tests. Viability (both in the density gradient and in wastes supplementation experiments) was analyzed using binomial generalized linear models (GLMs) with logit link function according to density, followed by Tukey post-hoc test to assess pairwise differences using the 'Multcomp' package (Hothorn et al., 2008). Mass and pupation height were analyzed using non-linear models (NLS) as described in Henry et al. (2018). In the waste-supplementation experiment, development duration and pupation height were analyzed using one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey tests.

Sequencing data were analyzed using a custom pipeline. Raw pair-end sequences files from Illumina were assembled using Flash software (Magoč and Salzberg, 2011) using at least a 10bp-overlap between the forward and reverse sequences, allowing 5% of mismatch. Dereplicating, denoising, clustering and chimera removing steps were sequentially performed using Galaxy tool "FROGS" (Escudie et al., 2016). We did not normalize the number of reads to the lower sample as it may induce statistical bias (McMurdie and Holmes, 2014). Nonetheless, a quick comparison of normalized vs non-normalized reads showed it provided similar results in both cases. Taxonomic

affiliation was defined using Silva132 16S database. When clearly incoherent affiliations were generated, a blast was performed in NCBI database and the identification was corrected if needed. A filter was applied to remove marginal diversity represented by low number of reads (< 0.05% of total number of reads per sample). Once these “cleaning” steps were performed, data were processed using ‘Phyloseq’ package in R (McMurdie and Holmes, 2013). Some sequences corresponding to *Wolbachia* were found (the bacteria probably recovered from the elimination treatment thanks to rare survivors). Yet, these sequences, represented only ~10% and ~1% in larvae and food, respectively. They were discarded in the subsequent steps of the analysis. After these steps, the resulting OTU table was used to compute alpha (richness and Shannon index) and beta (with Bray-Curtis distance) diversity tests (McMurdie and Holmes, 2013). Differences in the community composition in function of the sample type (larvae or food) and of the density level (LD, MD, HD) were tested using MANOVA on Bray-Curtis distance matrix (Anderson et al., 2006). OTUs were clustered at the genus level for graphical representation.

Results

Effects of larval crowding on flies phenotype

Development was significantly affected by larval density (Fig. 1A) ($F=62.07$, $df=8$, $p<0.001$). Flies from density levels higher than 100 were about 12 h slower to reach 50% of emerged adults than levels below 100. Above density 100, the distribution and variance of emergence events became much larger due to extreme individuals emerging up to 8 days after the adults reared at low density. Viability was strongly dependent on larval density (Fig. 1B) ($\chi^2=7907$, $df=1$, $P<0.001$). Within our tested range, we could capture the upper and the lower viability limit of our *D. melanogaster* population reared under crowded conditions. Density levels of 1 to 20 showed the maximal viabilities (80-90%), and each increasing density level diminished the viability until density 1000, where less than 3% of the deposited eggs turned into viable adults. Pupal and adult viabilities showed parallel decreasing patterns in function of density. Adult viability was only slightly lower than pupal viability, indicating that larval density mainly affects egg to pupae part of development. Body mass was also strongly reduced in higher densities, both in females and males and both in fresh and dry mass (Fig. 1C). Proprieties of the model allowed to highlight the lower limit of weight of flies, which appears to be around 400 eggs. mL⁻¹. The weight difference reached up to three-fold change between extreme density levels (*i.e.* 1 vs 1000). Pupation height was also rapidly affected by density (Fig. 1D). Larvae from low densities (1 to 20) tended to pupate very close to the food substrate, whereas larvae from higher densities clearly pupated higher in the vials, 50 mm over the surface in average.

Effects of larval crowding on nitrogenous wastes

Ammonia and uric acid concentrations were both dependent on larval density and on sample type (Fig. 1E & F) (density effect: $\chi^2=343$, $df=2$, $P<0.001$; $\chi^2=380$, $df=2$, $P<0.001$; sample type effect: $\chi^2=395$, $df=1$, $P<0.001$; $\chi^2=1079$, $df=1$, $P<0.001$; for ammonia and uric acid respectively). Ammonia was detected mostly in food, where concentrations were significantly higher in MD and HD than in LD conditions (Tukey HSD, $p<0.001$) (Fig. 1E). In contrast, ammonia was found at very low concentrations in larvae and there was no change according to density ($P>0.01$) (Fig. 1E). Uric acid showed a completely different pattern as it was barely detectable in food samples, but present in larvae (Fig. 1F). Uric acid concentration in larvae was negatively correlated with larval density, with highest value in LD, intermediate value in MD and lowest value in HD individuals (all significantly different, Tukey HSD, $p<0.001$).

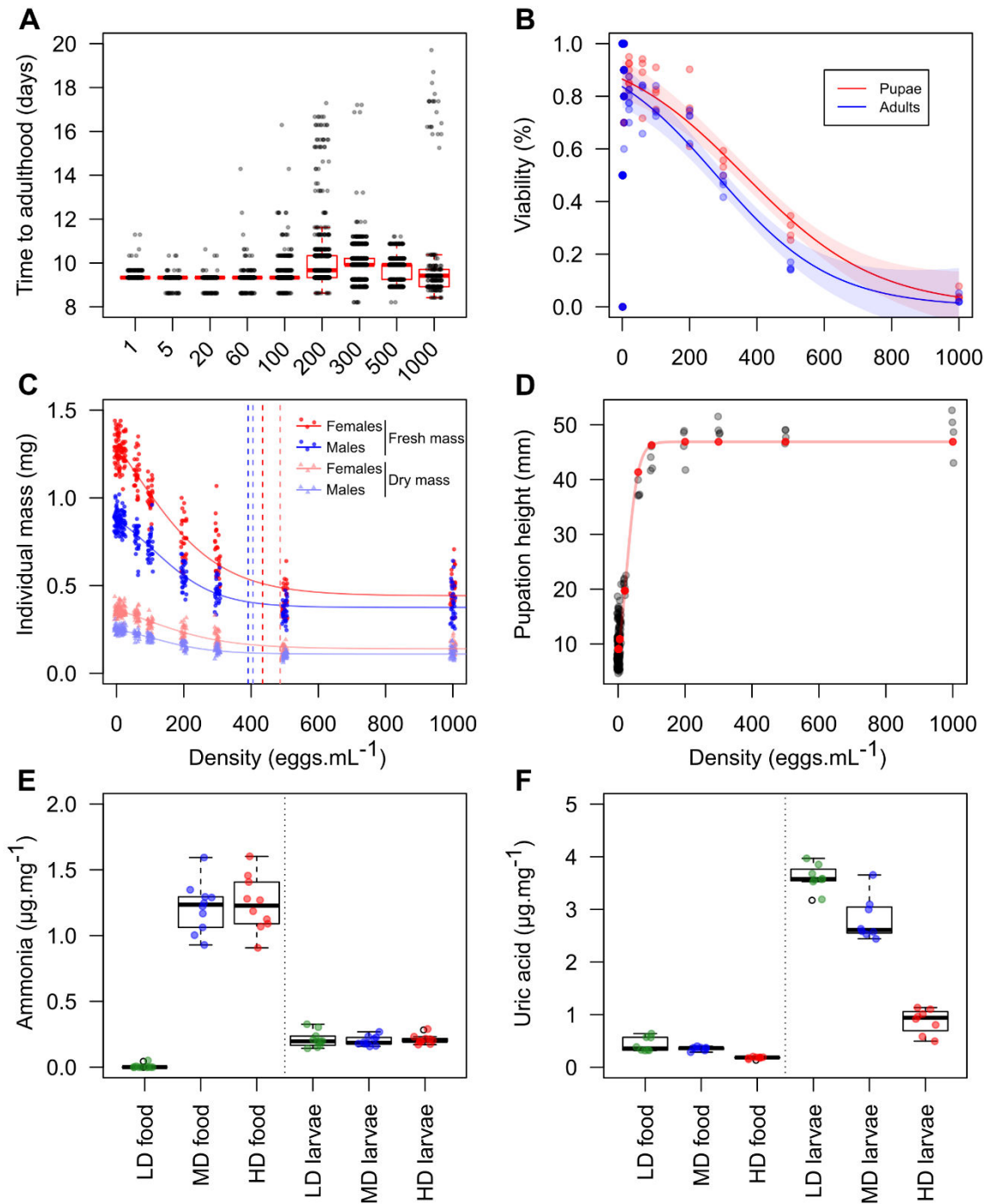


Figure 1: Direct consequences of larval crowding in *D. melanogaster*. (A) Development time to adulthood in function of larval density. Black dots: individual adult emergence events. Red boxes: first and third quartiles of the distribution. Red horizontal line: median of the distribution. (B) Viability from egg to pupae (red) and from egg to adult (blue) in function of larval density. Dots: mean viability per culture vial. Lines: predictions from binomial GLM. Shaded areas: 95% confidence intervals around predictions. (C) Fresh and dry masses of female and male adult individuals in function of larval density (N=30 per sex per density). Dots: individual mass measurements. Lines: predictions from NLS model. Horizontal dashed lines: stabilization threshold of mass calculated from model proprieties. (D) Pupation height in function of larval density. Dots: mean pupation height per vial. Red line and dots: prediction from NLS model. (E) and (F) Boxplots of ammonia (N=10 per sample type per density) and uric acid (N=8 per sample type per density) concentrations, in larvae and food

samples from LD, MD and HD conditions. Boxes: first and third quartiles of the distribution. Black horizontal line: median of the distribution.

Effects of larval crowding on bacterial communities

Microbiota diversity was affected by sample type and by larval density, whatever the considered index (Fig. 2A-D). Bacterial communities were significantly different between larvae and their environment ($F_{1,30}=10.94$, $P=0.002$; $F_{1,30}=37.79$, $P<0.001$; for observed richness and Shannon diversity respectively) and was also significantly modified by larval density ($F_{2,30}=8.19$, $P=0.001$, $F_{2,30}=13.74$, $P<0.001$; for observed richness and Shannon diversity respectively). However, we found no significant pairwise difference in richness in function of larval density (Tukey HSD, $p>0.05$ for all densities comparisons). For Shannon index, no pairwise difference according to larval density was found in larvae (Tukey HSD, $p>0.05$ for all densities comparisons), however, significant differences were detected among densities in food substrates, with higher diversity in HD than in LD and MD foods (Tukey HSD, $p<0.001$). Beta diversity was largely impacted by larval densities in food samples but not in larval gut samples (Fig. 3C). Both larval density ($F_{2,30}=6.40$, $P<0.001$), sample type ($F_{1,30}=7.58$, $P<0.001$), and their interaction ($F_{2,30}=5.97$, $P<0.001$) had significant effect on Bray-Curtis distances, explaining respectively 21, 12 and 19% of the total variance. The figure 2D shows clear-cut and consistent differences in bacterial composition of the food according to larval density, while only subtle changes in bacterial composition were found in larval gut microbiota. Even if the global bacterial community in larvae did not drastically change with density, we could note the apparition of *Lactobacillus* OTUs in MD larvae (and to a lesser extent in HD); these *Lactobacillus* were almost absent in LD.

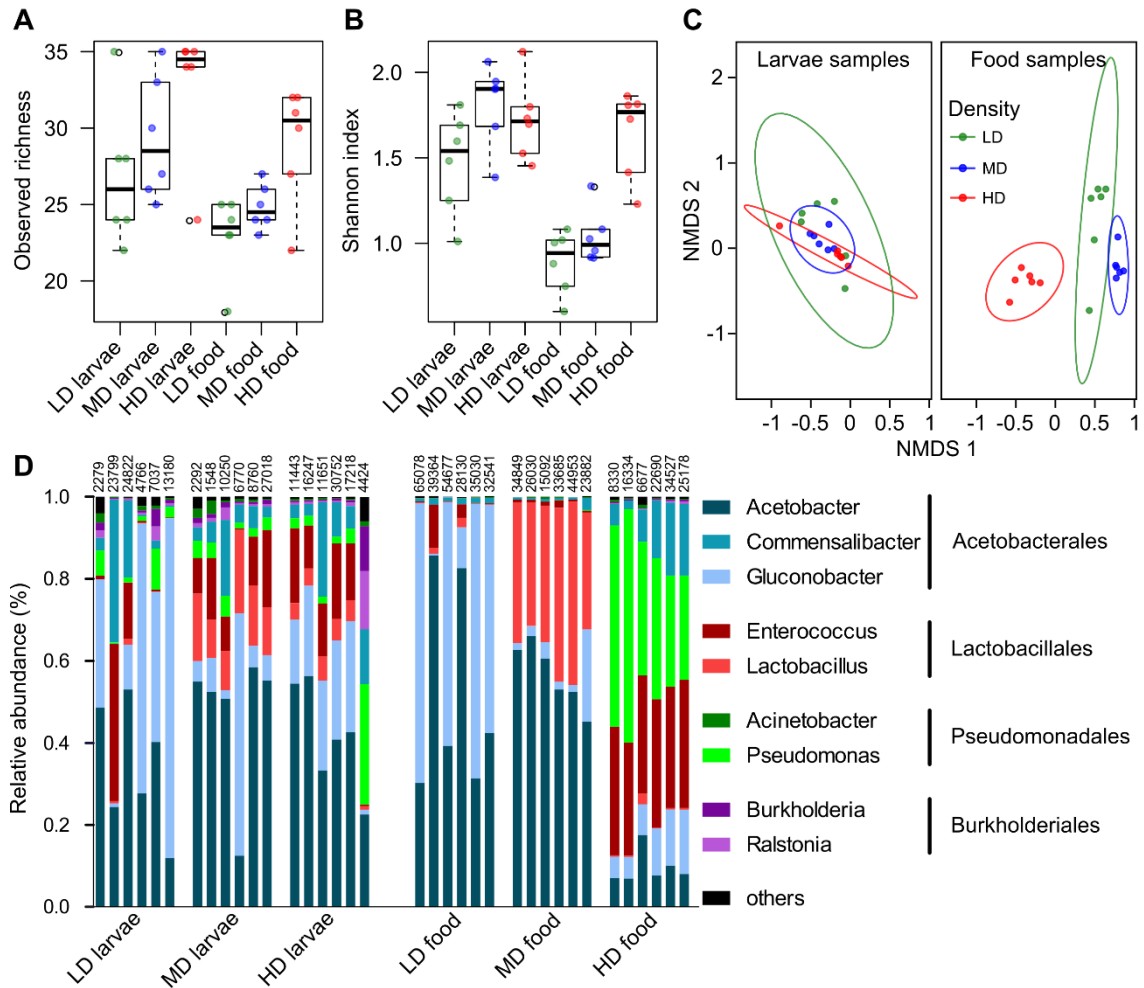


Figure 2: Bacterial community variations in *D. melanogaster* larvae and in its environment, at increasing population densities. (A) and (B) Boxplots of observed richness and of Shannon diversity respectively in LD, MD and HD conditions. Dots: sequencing replicates diversity values. Boxes: first and third quartiles of the distribution. Black horizontal line: median of the distribution. (C) NMDS Bray-Curtis ordination of bacterial communities in LD, MD and HD condition, split by sample type (larvae or food). Dots: sequencing replicates, colored by rearing density. Ellipses represent 95% confidence zones. (D) Stacked barplot of sequenced OTU, grouped at the genus level. Number of reads effectively used per replicate is displayed on top of bars.

Effects of metabolic wastes supplementation

Supplementation of metabolic wastes had a significant effect on development (Fig. 3A) ($F_{3,205}=20.67$, $P<0.001$). Supplementation of ammonia consistently increased the development time by about half a day compared to the control without supplementation (Tukey HSD, $p<0.001$). Uric acid alone had no effect on development time compared to control (Tukey HSD, $p=0.218$). We found no significant effect of supplementation on neither viability nor pupation height (Fig. 3B & C) ($\chi^2=3.90$, $df=3$, $P=0.272$; $F_{3,207}=1.11$, $P=0.345$; for viability and pupation height respectively). Viability was superior to 80% in all treatments, which is comparable with values found in the first

experiment at similar larval density. Pupation height was comprised between 10 and 15 mm in all conditions, which is also comparable to heights found in the first experiment for the same density.

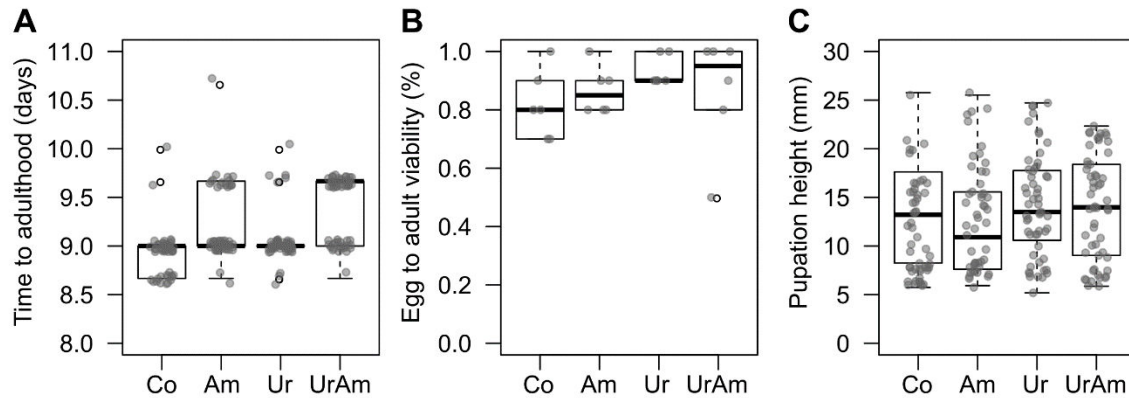


Figure 3: Effects of artificial supplementation of metabolic wastes on development and pupating behavior in *D. melanogaster*. (A) Development time to adulthood in control flies and in the three supplementation treatments. Dots: individual adult emergence events. (B) Percentage of viable adults emerged from deposited eggs. Dots: mean viability per vial (N=6). (C) Pupation height. Dots: individual pupation heights. For all plots, boxes: first and third quartiles of the distribution. Black horizontal line: median of the distribution.

Discussion

Crowding is usually regarded as a source of nutritional stress. When a fixed amount of food has to be shared by an increased number of individuals, the quantity available per individual unavoidably shrinks. Klepsatel et al. (2018) highlighted this phenomenon in flies, showing that marked phenotypic changes generated by a gradual nutrient depletion during crowding could be rescued by yeast supplementation, or conversely induced without crowding by yeast deprivation. For traits such as development, lifespan, or metabolic state, it implies that crowding as a stressor could almost be considered equivalent to a simple dietary restriction. In this study, we first characterized the strong phenotypical consequences of different larval densities, and then, we explored some least characterized aspects of crowding, such as the role of toxic metabolic wastes and the impact of larval density on bacterial communities in food and larval guts.

Larval crowding generated large variations in all measured phenotypic traits (development, survival and morphology). The present data are therefore in complete agreement with our previous observations (Henry et al., 2018) and also provide additional descriptions of crowding effects for instance on behavioral traits (*i.e.* pupation site selection). We can now rather precisely predict the extreme limit of viability under crowding: less than 3% of eggs in average should attain the adult stage when density is over 1000 eggs.mL⁻¹. Strikingly, about 20% viability is still attainable with 500 eggs.mL⁻¹, highlighting the great competitive ability of fruit flies. Decreased viability with larval density likely reflects, at least in part, that an increasing number of individuals were unable

to reach critical mass for pupation (Mirth et al., 2005). In line with this observation, mass showed a clear decline with increasing larval density (Scheiring et al., 1984; Shenoi et al., 2016), followed by a plateau at the density levels of 400 and above. This plateau suggests that a critical minimal viable mass was reached in our population at around one third of the normal mass. Although we observe a developmental delay at high densities, it did not exceed one day for the median time. However, above density level of 100, the distribution and variance became much larger due to extreme individuals. The time to reach 95% of adult emergence showed a delay of 8 days separating density levels 1 and 1000. Higher variance at high densities is probably the consequence of contrasted responses: some individuals were rapid enough to profit from early non-degraded conditions while the others were exposed to increasingly degraded food which generated a developmental delay.

Nitrogenous wastes are generally toxic. Ammonia is known for its cytotoxic activity, impeding respiratory metabolism and membrane ion transporters (Henry et al., 2017; Weihrauch et al., 2012) and urea, although being less toxic, can impair development and survival of species through protein denaturation (David et al., 1999). Uric acid can show positive effects by preventing oxidative damages or water loss (Andersen et al., 2010; Hilliker et al., 1992), but may also trigger detrimental inflammatory reactions (Sautin and Johnson, 2008). Consequently, we expected that crowding, by increasing wastes concentration, would be stressful to larvae. Notably, we observed changes in the larval behavior with a significant increase in the pupation height at high densities, in accordance with previous findings (Joshi and Mueller, 1993). This behavior is likely the outcome of contrasted larval foraging strategies that have been observed in density-selected lineages (Sokolowski et al., 1997) and we hypothesized that increased pupation height resulted from a need to avoid proximity with toxic products (Belloni et al., 2018). Instead, we found that pupation height was unchanged in larvae reared at low density, even when toxic metabolic wastes were artificially supplemented in the food to mimic the outcome of larval crowding. Therefore, the increase in pupation height could be a consequence of nutritional restriction or interindividual relations like cannibalism (Vijendravarma et al., 2012), rather than an avoidance of toxic wastes. Wastes supplementation had also limited impact on individuals, inducing only a minor developmental delay and no additional mortality. Our results seem to corroborate the conclusions of Klepsatel et al. (2018) that, for these traits, nutritional restriction as a stressor outshines other stress resulting from larval crowding.

In insects, the main waste products of nitrogenous metabolism are uric acid, urea and ammonia (Bursell, 1967; O'Donnell and Donini, 2017). Even in model species like *D. melanogaster*, it remains unclear whether uric acid is the major waste product, as in many Dipterans (Bursell, 1967; Dow and Davies, 2003) or if other compounds contribute to the excretion. Urea is supposed to occur naturally in *Drosophila* cultures (Joshi et al., 1996) and previous studies actually found increasing levels of urea in food in case of overfeeding (Botella et al., 1985) or with increasing larval densities

(Henry et al., 2018). On the other hand, Etienne et al. (2001) suggested that *D. melanogaster* is unable to produce this compound. The presence of urea in food may thus result from conversion of products such as uric acid by the action of aerobic *bacteria* (Bachrach, 1957; Potrikus and Breznak, 1981; Winans et al., 2017). Borash et al. (1998) reported that ammonia is the primary metabolic waste product of *D. melanogaster* larvae but other studies rather posits that uric acid is the main waste product of nitrogen metabolism (Botella et al 1995; Winans et al 2017). Finally, products such as allantoin were also found in the food medium, but have not been measured in flies (Borash et al., 1998; O'Donnell and Donini, 2017). According to this literature, we can speculate that all these compounds could be present in the medium, though in variable amounts. Our results confirm the presence of ammonia in food, with high levels detected in MD and HD conditions. On the other hand, we only found traces of uric acid in the food but surprisingly higher amounts in larvae. This suggests that *D. melanogaster* larvae produce and accumulate uric acid, probably in tissues such as the fat body or in Malpighian tubules (Weihrauch et al., 2012), but this compound seems to quickly degrade once in the environment. Consequently, the presence of urea and ammonia in food may either result from an effective excretion of these products by larvae, or from the degradation and transformation of uric acid in the environment. In other words, uric acid could degrade either inside the larvae or outside the larvae (fig. 4).

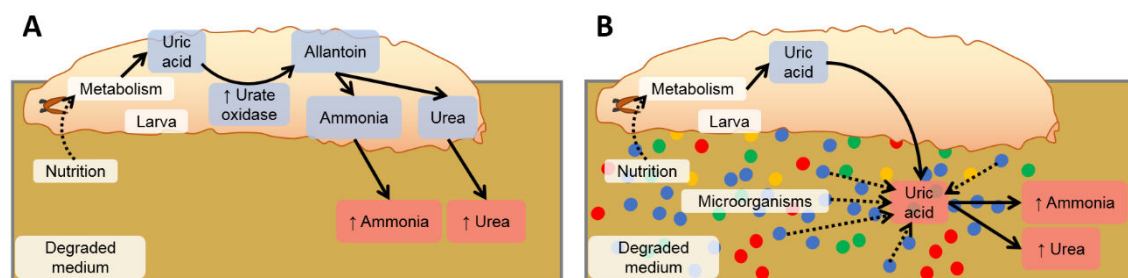


Figure 4: Conceptual visualization of nitrogen excretion in the lab *D. melanogaster* system. (A) Nutrition is used in larva's metabolism and degraded to uric acid, then to intermediate products and finally to ammonia or urea through the uricolytic pathway before being defecated in the food. (B) Nutrition is used in larva's metabolism and degraded to uric acid, which is directly excreted in the hindgut or defecated in the food, and used by microorganisms transforming them into ammonia and urea.

The classic pathway of uric acid degradation involves the urate oxidase enzyme, coded by the *uro* gene in *D. melanogaster* (Friedman, 1973; Wallrath et al., 1990). *Uro* showed increased expression with increased larval densities (Henry et al., 2018), and this could have played a role in the reduction of uric acid content observed in MD and HD (fig. 4A). In addition, the progressive nutrient depletion in crowded conditions limited the amount of digestible material (particularly purines) and therefore may have reduced uric acid production. Alternatively, uric acid could be excreted by

larvae and used as a nitrogen resource by surrounding microorganisms (fig. 4B). This hypothesis is supported by previous observations in termites (Potrikus and Breznak, 1981) and by recent findings showing a functional selection for uric acid metabolization in some bacteria taxa associated with laboratory cultures of *Drosophila* flies (Winans et al., 2017). Indeed, Winans et al. (2017) reported that uric acid accumulated substantially in the medium of axenic flies cultures, but not in the medium of flies harboring bacteria with functional urate oxidase gene. We can expect that in crowded conditions, bacteria experienced even more this selection pressure with unusually high wastes levels. The clear-cut changes between bacterial communities identified in the environment of LD, MD and HD are in line with this assumption. From a community largely dominated by *Acetobacterales* (*Acetobacter sp* and *Gluconopacter sp*) in LD, environment changes modified the species composition with the apparition of *Lactobacillus sp* in MD. In HD, changes totally reshaped the community, reducing the abundance of *Acetobacterales* but allowing to *Enterococcus* and *Pseudomonas* species to thrive. This is especially interesting since the *Lactobacillus* genus is known to be a good cooperater with flies (Newell and Douglas, 2014; Storelli et al., 2011), that demonstrate high dependency upon host's diet as a driving evolutive force (Martino et al., 2018). Hence, observed improvements of stress tolerance and lifespan at intermediate densities (Henry et al., 2018; Moghadam et al., 2015; Shenoï et al., 2016; Sørensen and Loeschcke, 2001) could be the result of an Allee effect favoring development of specific bacteria that happens to be beneficial (Wertheim et al.). Conversely, *Pseudomonas* genus is known for its pathogenicity against *Drosophila*, and could have intensified detrimental effects of high larval densities (Apidianakis and Rahme, 2009; Vodovar et al., 2005). However, bacterial changes appear to be limited to the environment, with few impacts on larval microbiota. The only concomitant modification we observed in food and in larvae is the apparition of *Lactobacillus sp* starting from intermediate densities. Aside from this minor alteration, the gut community was surprisingly independent to external changes. Therefore, in our laboratory population, *D. melanogaster* larvae may have established stable mutualistic relationships with bacteria able to cope with occasional dietary alterations and mitigate opportunistic colonization by new species. Stable mutualistic relationships between flies and gut microbiota have previously been observed in wild *Drosophila* species feeding on mushrooms, and harboring bacteria that are almost absent in the environment (Martinson et al., 2017). Our observation of stable relationships between flies and gut microbiota in a laboratory context is relevant because it shows that flies may gain advantages controlling their microbiota, even in favorable environment, generally assumed to lead to transient bacterial communities (Blum et al., 2013). Soen (2014) proposed that rapid environmental changes would change microbiota; this would affect the host in return, snowballing into a dysbiosis state. Here, we found that the constant ingestion of food was not regulating gut microbiota composition. Mechanisms underlying the control of microbiota by larvae remain elusive (Erkosar and Leulier, 2014). Co-adaptation over many generations in laboratory conditions is probably involved, especially the selection for

functional traits improving bacteria fitness such as the loss of motility and uric acid degradation ability (Winans et al., 2017).

Larval crowding is a complex ecological situation. Here, while we measured large metabolic wastes variability depending on larval density, we could not establish a link between wastes and observed phenotypical and behavioral changes. Nonetheless, wastes may still apply a strong pressure to the holobiont and affect the stability of the relationship. We highlighted microbial composition modifications in food associated with density-dependent changes in metabolic wastes. This represents one of the few examples where macroorganism action can actually shape the biotic micro-environment through abiotic alterations (Stamps et al., 2012; Wong et al., 2015b). Future studies will need to solve the apparent paradox of larval microbiota stability in changing environments, when evidences accumulate in favor of diet-centered rather than host-centered adaptation (Martino et al., 2018; Winans et al., 2017). A key here is to understand why some bacteria are transient whereas some others can persist in the gut, and why this dichotomy parallels laboratory vs wild bacteria (Pais et al., 2018). The use of germ-free eggs and gnotobiotic individuals at high larval densities could help to unravel the dynamics of the relationship in these complex situations.

Supplementary material

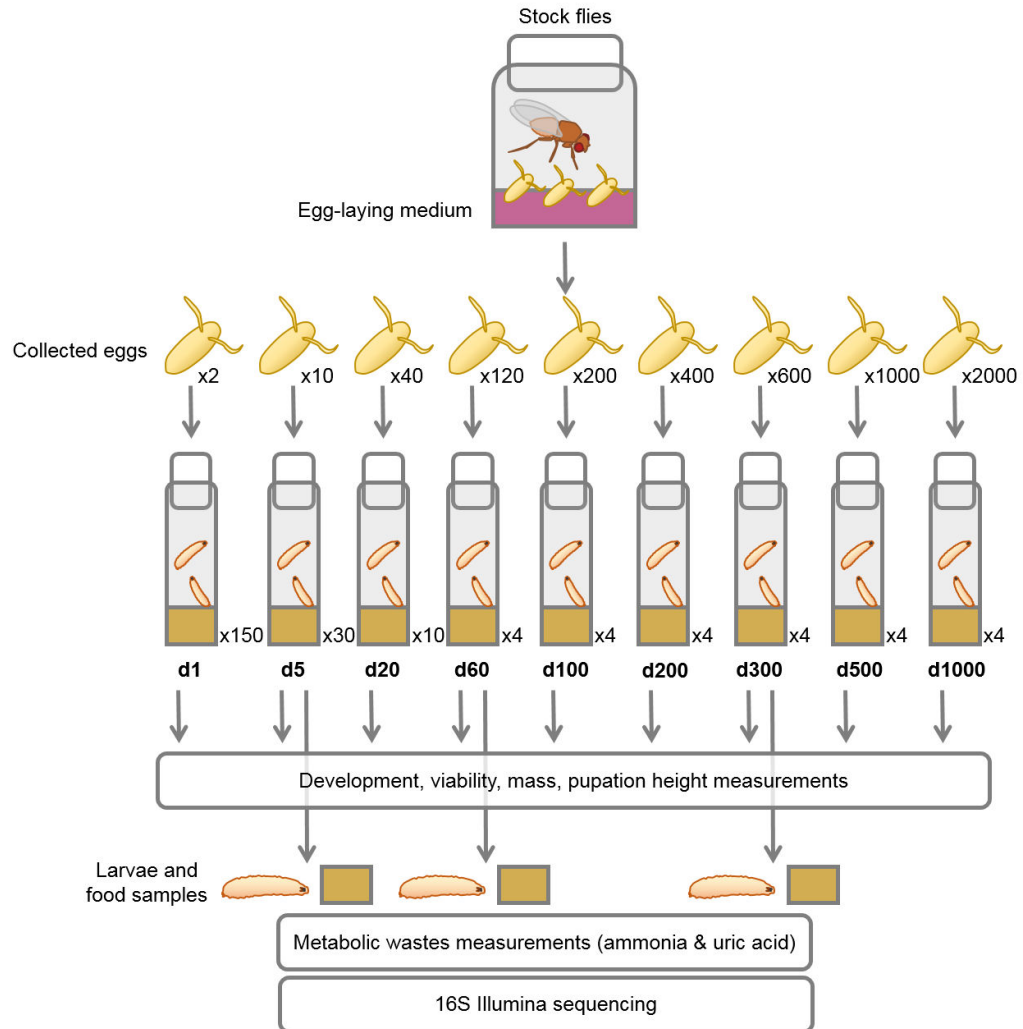


Figure S1: Experimental procedure for testing life-history traits, development, behavior, toxic wastes concentration, and bacterial community variations under increasing larval densities.

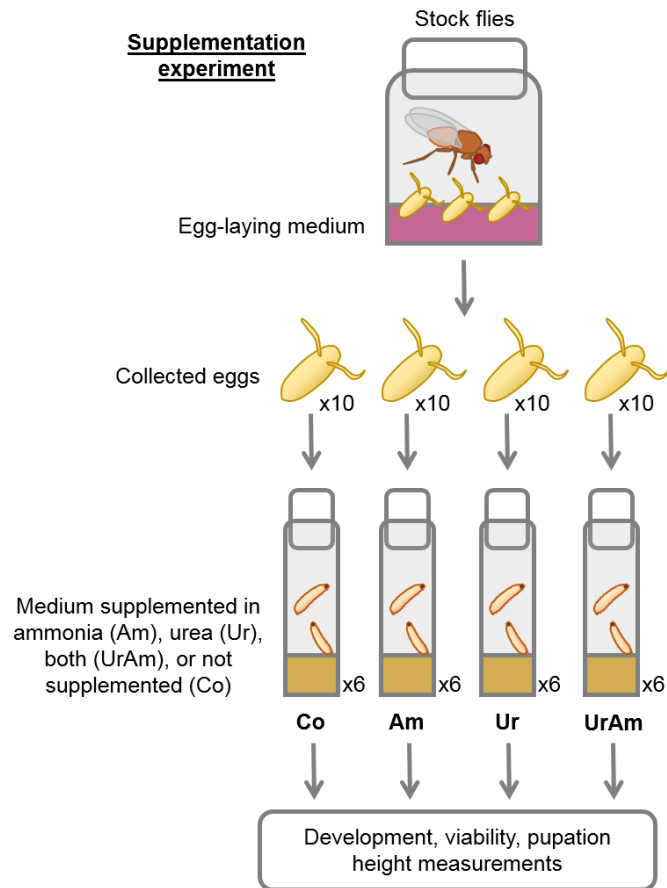
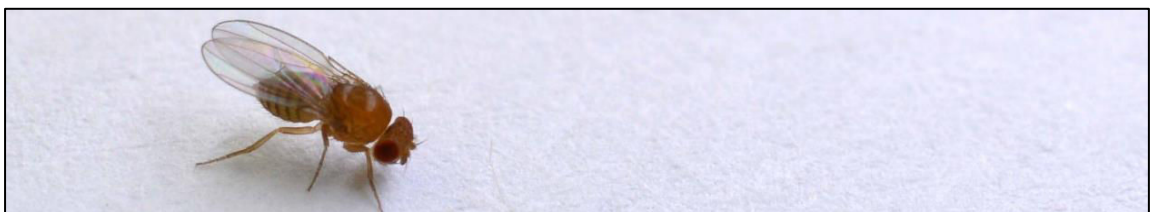


Figure S2: Experimental procedure for testing toxic effects of nitrogenous wastes independently from larval density.

Chapitre 4 - Discussion et perspectives



1. Discussion générale

La nutrition et le microbiote intestinal jouent un rôle important dans la survie des insectes face aux contraintes de l'environnement (Andersen et al., 2010a; Douglas, 2015; Sisodia et Singh, 2012). Toutefois, de par le renouvellement conceptuel pour la nutrition (Boggs, 2009; Fanson et al., 2009; Galenza et al., 2016; Lee et al., 2008a; Mair et al., 2005; Simpson et Raubenheimer, 2012) ou la relative nouveauté de la thématique pour le microbiote (Douglas, 2015; McFall-Ngai et al., 2013), nos connaissances sur leurs effets restent encore largement incomplètes. En particulier, la complexité des interactions réciproques entre nutrition et microbiote intestinal n'est pas encore bien appréhendée. Pour le moment, l'essentiel des travaux se concentre sur les effets nutritionnels du microbiote sur les insectes: le microbiote permet des apports en vitamines B, sert de substrat nutritif, synthétise des acides aminés, ou encore détoxifie les déchets métaboliques (Douglas, 2009). Pourtant, cette interaction nutrition-microbiote pourrait aller au-delà de ces effets proximaux. Elle pourrait affecter de façon indirecte des traits phénotypiques qui possèdent une pertinence écologique forte, à l'instar de la tolérance au stress (Carey et Duddleston, 2014; Soen, 2014).

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était de comprendre les relations entre nutrition et tolérance au stress ainsi qu'entre microbiote et tolérance au stress chez *D. melanogaster*, en profitant des techniques de manipulation et de mesure (de la nutrition, du microbiote, et de la tolérance au stress) développées chez cette espèce. Un fil conducteur de la thèse était aussi de pouvoir intégrer l'influence que peut avoir la nutrition sur le microbiote ou inversement le microbiote sur la nutrition, afin de discriminer les effets simples des effets conjoints.

Dans l'article 1, nous avons montré que la tolérance au stress froid pouvait être réduite par une altération artificielle du microbiote intestinal. Pour aller plus loin, dans l'article 2, nous avons démontré que les effets physiologiques et développementaux du microbiote peuvent être modulés par l'alimentation. La tolérance au stress de jeûne et de dessiccation varie de façon cohérente avec ces changements. Cependant, la tolérance au stress froid est systématiquement améliorée par le traitement antibiotique. Dans l'article 3 nous avons montré que la surpopulation, un stress nutritionnel complexe, modifie radicalement le phénotype des individus (taille, développement, profil métabolique), et que ces changements sont associés à une amélioration de la tolérance aux stress chaud et froid. Dans l'article 4, nous avons souhaité faire converger les thématiques de surpopulation et du microbiote intestinal. Nous avons mis en évidence que la surpopulation affecte profondément les communautés de microorganismes environnementaux, mais pas le microbiote intestinal. Nos résultats suggèrent que la communauté microbienne est sensible aux changements de composition du substrat nutritif, et notamment à l'accumulation de certains déchets métaboliques.

Dans la suite de cette discussion je commente ces résultats dans leur ensemble, au regard de la littérature. Je présente pour commencer la relation entre nutrition et phénotype de l'hôte, puis je décris l'importance de la nutrition pour l'abondance et la diversité du microbiote, et je termine par parler des effets du microbiote sur le phénotype, en mentionnant ici encore le rôle de la nutrition. Enfin, je termine en montrant les limites de nos travaux et propose des pistes de recherches (déjà débutées ou spéculatives) permettant de compléter nos résultats.

1.1. Le phénotype sous l'influence de la nutrition

Nous avons testé trois grands types de modification de la nutrition : 1) la réduction globale de l'alimentation (*i.e.* restriction calorique, articles 2, 3 et 4), 2) la réduction de nutriments spécifiques, notamment en jouant sur l'équilibre sucres/protéines (article 2), 3) l'altération qualitative du milieu, à travers l'accumulation de composés toxiques tels que les déchets métaboliques (articles 3 et 4). Toutes ces modifications ont généré des effets sur le phénotype des *Drosophiles*. Toutefois, nos résultats, en particulier ceux de l'article 2, tendent à montrer que les équilibres alimentaires sont la véritable clé de voûte des effets nutritionnels.

1.1.1. Restriction alimentaire et équilibre nutritionnel

En situation de choix, c'est-à-dire quand les insectes ont la possibilité d'ingérer un macronutriment sans en ingérer un autre, les individus modifient leur consommation de façon à maximiser leur fécondité (Fanson et al., 2012; Jensen et al., 2012; Lee et al., 2008a). La compensation nutritionnelle pour l'apport en macronutriments spécifiques plutôt que l'ajustement global des apports caloriques (indifféremment de la composition du substrat nutritif) témoigne que la qualité nutritionnelle a plus d'importance que les aspects quantitatifs (Boggs, 2009; Corrales-Carvajal et al., 2016; Leitão-Gonçalves et al., 2017). En situation de non-choix cependant, les insectes doivent mettre en place des stratégies de compromis, par exemple en cherchant à atteindre coûte que coûte l'apport dans un nutriment spécifique au prix de l'ingestion insuffisante ou excessive d'un autre nutriment. De tels compromis peuvent conduire à l'apparition de phénotypes désavantageux, comme les phénotypes obèses (*protein leverage hypothesis*) (Simpson et Raubenheimer, 2005). Chez les insectes, la quantité et la qualité des apports en protéines sont souvent les éléments limitants de l'alimentation (Fanson et al., 2012; Felton, 1996; Lee et al., 2008b). Dès lors, il n'est pas surprenant d'observer chez *D. melanogaster* un appétit centré autour des apports protéiques, quelles que soient les concentrations en autres macronutriments (Fanson et al., 2012; Lee et al., 2008a).

Nos résultats vont aussi dans ce sens. Nous avons observé des réponses marquées aux conditions de restriction calorique. Que la restriction soit provoquée par la dilution du milieu nutritif (article 2) ou par l'augmentation de la densité larvaire (articles 3 et 4), les individus étaient systématiquement plus petits, avec des temps de développement longs, et des réserves énergétiques orientées vers les carbohydrates. Cependant, nous avons aussi observé des phénotypes très

similaires pour des individus n'ayant subi qu'une privation en levures, mais dont le substrat restait calorique car riche en sucres (article 2). C'est donc l'absence de levures (*i.e.* de protéines) qui semble être à l'origine de la plasticité développementale, et non la restriction calorique. Dans le cas de la surpopulation, cette même conclusion est tirée par Klepsatel et al. (2018) qui ont reproduit les phénotypes d'individus issus de fortes densités larvaires chez des individus élevés à faible densité, en limitant simplement l'apport de levures. Un autre indice de cette importance des levures transparait dans nos analyses de préférences alimentaires. Les individus vivant sur des milieux riches à la fois en levures et en sucres, ainsi que les individus vivant sur des milieux riches en levures mais pauvres en sucres présentaient une quasi absence de préférence pour l'un ou l'autre de ces nutriments. Indépendamment de la quantité de sucres, nous avons observé que les protéines sont donc capables d'induire une satiété. A l'inverse, les individus privés de levures durant leur développement ont montré une préférence marquée pour les levures, qu'ils aient eu accès au sucre ou non (article 2).

L'extension de la durée de développement que ce soit en surpopulation ou via la restriction de l'accès aux protéines, reflète l'augmentation du temps passé par les larves à ingérer du milieu (articles 2, 3 et 4). Même si cet ajustement comportemental permet d'améliorer l'apport en nutriments limitants (acides aminés principalement), il reste insuffisant pour assurer une nutrition optimale (Fanson et al., 2012; Lee et al., 2008a) ou parfois même assurer la viabilité (article 3). Lorsque les apports ne peuvent plus soutenir des fonctions de reproduction et de croissance (Edgar, 2006; Koyama et al., 2013), le métabolisme bascule depuis le « mode reproduction » vers le « mode survie » (Kolss et al., 2009; Rion et Kawecki, 2007; Tatar et al., 2003). Ce basculement est vraisemblablement lié à un compromis de l'allocation interne des ressources nutritionnelles (Chippindale et al., 1993). De façon surprenante, l'alimentation sous-optimale peut donc améliorer la survie de l'organisme en redirigeant les ressources vers des traits tel que la tolérance au stress. C'est le cas pour la tolérance au jeûne (Chippindale et al., 1993; Rion et Kawecki, 2007; Zwaan et al., 1991b), au stress oxydant (Lushchak et al., 2011; Vigne et al., 2009), à la dessiccation (Andersen et al., 2010), ainsi qu'au stress thermique (Andersen et al., 2010a; Heinrichsen et Haddad, 2012; Sørensen et Loeschcke, 2001).

Nous avons trouvé que la restriction nutritionnelle provoque une large amélioration de la tolérance au stress froid dans l'ensemble de nos expériences (articles 2 et 3), mais nous n'avons observé une amélioration de la tolérance au stress chaud qu'en cas de surpopulation larvaire (article 3, comme Arias et al., 2012; Sørensen et Loeschcke, 2001), et non lors de restriction en levures (article 2, contrairement à Andersen et al., 2010). Bien que les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes ne soient pas bien établis, nos travaux suggèrent quelques pistes intéressantes. Contrairement aux restrictions alimentaires au stade adulte (Hulbert et al., 2004), nous avons observé que la restriction alimentaire durant l'ensemble du développement réduit de façon conséquente la consommation

d'oxygène des adultes (article 2). La réduction de l'activité de respiration a pour conséquence de limiter la vitesse des processus physiologiques, et permet en particulier de diminuer la production d'espèces réactives de l'oxygène, aux propriétés oxydantes et donc cytotoxiques (Sohal et Weindruch, 1996). En cas de stress thermique, les mécanismes éliminant progressivement ces composés et maintenant l'homéostasie cellulaire sont perturbés, et les dommages oxydatifs s'accumulent d'autant plus rapidement que le métabolisme est élevé (Finkel et Holbrook, 2000; Lalouette et al., 2011; Sohal et Weindruch, 1996). Le métabolisme réduit que nous avons observé chez les individus privés d'accès aux levures pourrait donc expliquer leur tolérance accrue. De plus, nous avons mesuré des quantités importantes de glucose (article 2 et 3) et de tréhalose (article 3) chez les individus les plus résistants, qu'ils soient issus de surpopulation ou bien de restriction alimentaire. Le glucose et le tréhalose correspondent aux métabolites les plus souvent rapportés comme étant centraux pour le *rapid cold hardening* (Overgaard et al., 2007), et pourraient donc générer une prédisposition à tolérer le stress froid. En particulier, ces deux composés sont des osmolytes compatibles, et ils sont donc impliqués dans la stabilisation des membranes et des protéines (Yancey, 2005). Enfin, les changements de profils lipidiques, et notamment l'augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés en condition de surpopulation (Moghadam et al., 2015), pourrait constituer une adaptation homéovisqueuse permettant la tolérance au stress froid (Brankatschk et al., 2018).

Nous avons retrouvé une amélioration de la tolérance à la dessiccation induite par le type de substrat nutritionnel (Andersen et al., 2010). Bien que la différence soit faible, les individus élevés sur les substrats riches en sucre ont présenté de meilleures survies face à la dessiccation, indépendamment des apports en levures. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation claire du contenu lipidique chez ces mêmes individus (Mayntz et al., 2005). En revanche, la tolérance au jeûne a été nettement améliorée pour les individus développés sur des milieux déséquilibrés vers un excès de sucres, et inversement, réduite pour les individus développés sur des milieux déséquilibrés vers un excès de levures. La privation à la fois en sucres et en levures a généré un phénotype de tolérance intermédiaire, semblable aux autres milieux équilibrés, mais riches en calories. Ce type de réponse se démarque du patron observé pour la plupart des autres traits comme le développement, la masse, ou le stress thermique par exemple (articles 2 et 3), puisqu'ici ce n'est pas un nutriment particulier qui dicte la réponse, mais bien l'équilibre entre l'apport en sucres et en protéines. La combinaison de ressources lipidiques importantes avec un métabolisme plus lent résultant d'une alimentation riches en sucres et pauvre en levures pourrait expliquer cet effet favorable (article 2, Djawdan et al., 1998; Marron et al., 2003; Sisodia et Singh, 2010).

La restriction alimentaire (calorique ou protéique) et la surpopulation larvaire semblent avoir des effets qui se recoupent, suggérant un certain partage des voies physiologiques à la base de la plasticité phénotypique et développementale observée (Klepsatel et al., 2018). Pour autant,

quelques divergences dans les réponses (principalement pour la tolérance au stress chaud) indiquent des particularités propres à chacune de ces modifications alimentaires. L'origine de la différence pourrait venir de la toxicité du milieu nutritif en surpopulation larvaire, causée par l'excrétion importante de déchets métaboliques azotés (articles 3 et 4, Borash et al., 1998; Botella et al., 1985).

1.1.2. Influence des déchets métaboliques

La particularité de la surpopulation larvaire est de combiner à la fois une restriction alimentaire et une certaine toxicité du substrat causée par l'accumulation d'urée (article 3, Botella et al., 1985), d'acide urique (Dow et Davies, 2003; Winans et al., 2017), ou encore d'ammoniac (article 4, Borash et al., 1998). Nous avons cherché ces composés, et avons détecté de l'urée et de l'ammoniac dans la nourriture des larves soumises aux fortes densités larvaires. Au moyen d'expériences de supplémentation, nous avons pu constater que l'ammoniac peut allonger le temps de développement (article 4), et que l'urée, dans des concentrations modérées, permet d'améliorer la tolérance au stress (article 3). L'urée étant une molécule protéotoxique (David et al., 1999), avec néanmoins des effets positifs sur la longévité (Joshi et al., 1996), nous avons émis l'hypothèse que la surpopulation, à travers un stress toxique, pourrait être à l'origine d'une réponse hormétique en densité intermédiaire, provoquant une tolérance croisée envers le stress froid (article 3). Un des mécanismes des phénomènes de tolérance croisée est l'expression de gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress (codant pour des enzymes antioxydantes et protéines chaperonnes : superoxyde dismutase, peroxydase, catalase, HSPs), qui permettent de répondre de façon ubiquiste à une large gamme de stress (Le Bourg et al., 2002; Sinclair et al., 2013). L'analyse ciblée sur quelques gènes d'intérêt de la famille des *Hsps* notamment ne nous a pas permis d'observer des surexpressions substantielles des gènes de stress en situation de surpopulation malgré quelques modulations d'expression de faible amplitude. Certains signes semblaient indiquer pourtant l'apparition d'un stress oxydant (article 3), lequel pouvant conduire à des phénomènes hormétiques ou de tolérance croisée (Costantini, 2014; Costantini et al., 2010). L'absence de réponse des *Hsps* n'est pas si surprenante, dans la mesure où certaines études considèrent ces gènes comme de mauvais candidats pour assurer les phénomènes de tolérance croisée (Bubliy et al., 2012a; Tammariello et al., 1999). Cependant, d'autres gènes pourraient être impliqués, et nous analysons actuellement des données de RNA-seq chez des larves en densités variables afin de compléter ces résultats. L'expression accrue du gène *uro* (impliqué dans la dégradation de l'acide urique) aux densités intermédiaires est prometteuse et il sera intéressant de se pencher attentivement sur les gènes impliqués dans la digestion et le métabolisme des purines.

De façon générale, les déchets métaboliques montrent des effets limités sur les larves ainsi que sur les adultes de *D. melanogaster*. A des concentrations réalistes, nous n'avons pas observé de baisse de viabilité, ni de comportement d'évitement des composés toxiques, comme nous pouvions nous y attendre (article 3) (Belloni et al., 2018; Etienne et al., 2001). Néanmoins, la présence de ces

molécules dans le milieu pourrait tout de même se révéler importante. Même si les larves y semblent peu sensibles, les microorganismes dans l'environnement ainsi qu'à l'intérieur du tube digestif pourraient être affectés par la présence de déchets azotés.

1.2. Le microbiote sous l'influence de la nutrition

Identifier les facteurs contrôlant l'abondance et la diversité microbienne du tube digestif des organismes est un sujet de recherche très actif actuellement (Broderick et Lemaitre, 2012; Martino et al., 2018; Pais et al., 2018; Wong et al., 2015b). Etablir les contributions respectives de l'environnement et l'hôte dans le maintien de la diversité microbienne est déterminant pour l'avancée de la compréhension des relations hôte-microbiote (Antwis et al., 2017). L'intérêt d'explorer cette question est multiple. D'une part, la composition du microbiote intestinal montre une forte capacité à altérer le phénotype de l'hôte (voir Douglas, 2018 pour une revue chez *D. melanogaster*). Et d'autre part, la stabilité de la régulation du microbiote peut être un prérequis à l'installation de relations mutualistes durables, avec de fortes conséquences évolutives (Brooks et al., 2016; Theis et al., 2016). Chez les espèces mammifères, bien que l'environnement affecte le microbiote intestinal, les espèces bactériennes du tube digestif sont clairement différentes de l'extérieur, et présentent une résilience face aux changements alimentaires (Lozupone et al., 2012; Zhang et al., 2012). Cela met en évidence la capacité de l'hôte à filtrer et favoriser activement un certain type de communauté. Chez certains insectes comme *D. melanogaster*, le milieu nutritif constitue aussi le milieu de vie, en particulier au stade larvaire. Dès lors, le contact permanent des individus avec les microorganismes extérieurs ainsi que la consommation incessante de nourriture sont considérés comme des éléments favorisant un microbiote transitoire et renouvelé en permanence (Erkosar et Leulier, 2014). Chez *D. melanogaster*, de nombreuses études confirment une forte variabilité inter-populations et inter-individus du microbiote sous la contrainte de l'alimentation (Chandler et al., 2011; Staubach et al., 2013; Wong et al., 2013), ou résultant de processus stochastiques (dispersion passive des bactéries et dérive écologique) (Adair et al., 2018; Obadia et al., 2017). Pourtant plusieurs résultats récents viennent nuancer cette vision. Par exemple, certaines bactéries semblent pouvoir s'associer de façon stable avec *D. melanogaster*, indépendamment de l'environnement (Pais et al., 2018). Il a également été observé que des populations sauvages de *Drosophiles* peuvent posséder des microbiotes aux compositions très différentes de celles de l'environnement, et adaptées à leur mode de nutrition (Martinson et al., 2017). En l'absence de contrôle de la part de l'hôte, l'hypothèse nulle est de considérer que le microbiote est nécessairement un sous-échantillon des communautés de microorganismes environnementaux. Ces résultats tendent à invalider cette hypothèse et impliquent donc que l'hôte joue un rôle actif dans la diversité et structuration de son microbiote.

Nos résultats apportent des arguments à la fois en faveur d'un certain contrôle des Drosophiles sur leur microbiote, mais montrent également une grande dépendance à l'environnement. Nous avons observé que la richesse en levures (mortes) de l'alimentation conditionne fortement l'abondance bactérienne. Sur milieux particulièrement pauvres en levures, l'abondance était quasiment réduite à un niveau comparable aux traitements antibiotiques (article 2). Dans un contexte différent, la diversité du microbiote intestinal n'a pas semblé être drastiquement affectée par le milieu chez les larves élevées en surpopulation et disposant donc d'un accès restreint aux levures (article 4). Mis à part l'apparition de *Lactobacillus sp* aux densités larvaires moyennes, nous avons constaté une remarquable robustesse du microbiote face aux altérations extrêmes du substrat. Cela nous a d'autant plus étonné que nous avons observé des communautés bactériennes environnementales très différentes d'une densité à l'autre, avec l'apparition et la disparition de taxons selon les conditions. Comme le suggèrent les travaux de Martino et al. (2018), les bactéries pourraient s'adapter à l'alimentation de l'hôte plutôt qu'à l'hôte lui-même. Cette adaptation au substrat est tout à fait vraisemblable dans les microcosmes artificiels des élevages de laboratoire, où l'alimentation est identique de génération en génération. Nos résultats suggèrent que les déchets métaboliques, et notamment l'acide urique, pourraient être d'une importance particulière pour les bactéries environnementales puisque la fonction de dégradation de l'acide urique est un trait positivement sélectionné lorsque les bactéries sont associées aux élevages de *D. melanogaster* (Winans et al., 2017). Enfin, il faut rappeler que nous avons travaillé ici sur le microbiote des larves, ce qui constitue une originalité par rapport au corpus de littérature sur le sujet. Il est tout à fait envisageable que la régulation du microbiote soit différente entre les stades larve et adulte, ne serait-ce qu'à cause de leur mode d'alimentation et de déplacement.

Ces résultats suggèrent que l'hôte pourrait être capable de modifier la diversité et d'influencer l'évolution des microorganismes environnementaux à travers la dégradation du substrat nutritionnel. Il reste à établir si ces changements de communautés microbiennes environnementales peuvent apporter un quelconque bénéfice pour l'insecte. La stabilité du microbiote interne que nous avons mis en évidence chez les larves indique qu'en dépit des changements externes, une forte régulation existe à l'intérieur du tube digestif. Seules quelques études ont travaillé sur la question, mais deux grands axes sont pour le moment privilégiés : 1) la régulation par le système immunitaire et notamment les peptides anti-microbiens (Buchon et al., 2009; Ryu et al., 2008), et 2) la régulation par l'équilibre acido-basique du tube digestif (Overend et al., 2016). Identifier les pressions qui contraignent la diversité et l'abondance du microbiote est crucial pour comprendre la nature de la relation hôte-microbiote et ses conséquences phénotypiques (Broderick et Lemaitre, 2012).

1.3.L'importance du microbiote intestinal pour le phénotype de l'hôte : un effet nutritionnel ?

Comme mentionné dans le chapitre 1, la nutrition de l'hôte est étroitement liée à son microbiote intestinal. Chez *D. melanogaster*, que ce soit à travers des effets directs (approvisionnement en acides aminés, vitamines, stérols) ou plus indirects (régulation des voies signalétiques de croissance et modification du métabolisme énergétique), le microbiote peut être à l'origine d'une large variabilité phénotypique (Douglas, 2018). La majorité des études s'étant intéressées aux effets du microbiote ont comparé des individus dont le microbiote était artificiellement retiré (axéniques) à des individus au microbiote non manipulé (conventionnels) ou éventuellement artificiellement défini (gnotobiotiques) (Brummel et al., 2004; Ma et al., 2015; Newell et Douglas, 2014). Très souvent, la ressource alimentaire était volontairement appauvrie afin d'exacerber les conséquences de l'axénie (Erkosar et al., 2017; Storelli et al., 2011; Yamada et al., 2015). Pourtant, quelques résultats indiquent que la nature de l'alimentation de l'hôte pourrait considérablement moduler ces effets (Jehrke et al., 2018; Wong et al., 2014). Il y a donc là l'opportunité d'affiner notre compréhension de la relation hôte-microbiote en diversifiant la gamme d'alimentation testée pour comparer des insectes conventionnels et axéniques. L'objectif est double : permettre d'évaluer la contribution des facteurs nutritionnels aux effets du microbiote sur des traits déjà bien caractérisés sur un nombre réduit de milieux (développement, métabolisme...), ainsi que d'explorer la capacité du microbiote à affecter des aspects encore peu caractérisés du phénotype de l'hôte (comme la tolérance au stress).

1.3.1.Plasticité développementale, métabolisme, et comportement nutritionnel : quelle est la contribution du microbiote intestinal ?

En conditions de stress nutritionnel, l'altération du microbiote est généralement associée à un temps de développement plus long (Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011), des masses réduites (Shin et al., 2011), un métabolisme plus lent (Ridley et al., 2012), ainsi que des réserves énergétiques perturbées (hyperlipémie, hyperglycémie) (Ridley et al., 2012; Wong et al., 2014). Au cours de nos expériences, nous n'avons pas systématiquement vérifié ces résultats. Lorsque nous les avons vérifiés, ils étaient généralement nutrition-dépendants, apportant donc un nouvel éclairage sur ces phénomènes : cela suggère que les effets du microbiote doivent être considérés préférentiellement au sein d'un référentiel nutritif donné, et que « l'effet microbiote » dans absolu ne fait pas toujours sens.

Nous n'avons pas observé d'effet du microbiote sur la masse des individus ainsi que sur leur contenu lipidique, et ce, quelle que soit la composition nutritionnelle du substrat (article 2). Cela n'est pas si surprenant dans la mesure où beaucoup d'autres études échouent à mettre en évidence cet effet masse (Newell et Douglas, 2014; Storelli et al., 2011a; Wong et al., 2014a), et que l'effet

sur les lipides est lui aussi inconstant (Ridley et al., 2012). L'absence d'effets sur tous ces traits peut avoir de nombreuses origines, et ne remet en doute ni nos travaux, ni les travaux précédents. Deux études de *genome wide association* ont élégamment mis en évidence que la composition bactérienne (Chaston et al., 2016), ainsi que les indices nutritionnels (poids, réserves lipidiques, réserves glucidiques...) (Dobson et al., 2015), étaient largement dépendants du génotype de l'hôte. Cela signifie que les effets microbiote-dépendants ne sont pas sous forte contrainte de sélection et peuvent répondre à la variation génétique de l'hôte (Dobson et al., 2015). Même si une tendance générale du sens de l'effet se dégage parfois, ces résultats témoignent de la variabilité générale des traits liés au microbiote intestinal.

En revanche, nous avons observé un net retard de développement chez les individus au microbiote altéré, allant jusqu'à 4 jours sur un développement qui en demanderait normalement 14 (article 2). C'est une des signatures les plus robustes de l'altération du microbiote, que l'on retrouve dans l'ensemble des études sur le sujet (*e.g.* Erkosar et al., 2017; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011; Wong et al., 2014). Néanmoins, nous n'avons constaté ce retard que chez les individus issus de milieux déséquilibrés, à la fois riches en sucres et pauvres en levures, mais pas chez les individus issus de milieux globalement pauvres. C'est un résultat conforme aux travaux de Wong et al. (2014), mais qui pourtant véhicule un message original qui n'est pas discuté sous cet angle dans l'article : ce n'est pas la pauvreté en levures qui est à l'origine du retard de développement, mais principalement l'excès en sucres (Colinet et al., 2013a; Musselman et al., 2011). L'hypothèse qui pourrait être avancée est que les importantes quantités de sucre peuvent limiter la consommation de nourriture (Edgecomb et al., 1994; Lee et al., 2008a), pourtant ce n'est pas ce que nous avons observé dans nos expériences. Par conséquent, la différence de temps de développement entre mouches axéniques et mouches conventionnelles ne peut pas être entièrement justifiée par l'aide qu'apporte le microbiote aux fonctions de digestion (notamment en favorisant l'accès à certains acides aminés), ainsi que par l'action des genres *Lactobacillus* et *Acetobacter* sur les voies signalétiques de régulation de la croissance (TOR et IGF, particulièrement sensibles aux protéines) (Erkosar et al., 2017; Storelli et al., 2011; Yamada et al., 2015). L'excès de sucres génère des problèmes physiologiques potentiellement létaux (Colinet et al., 2013a), causés en partie par la production de lipides hydrolysés ou estérifiés (toxiques) et la réduction de l'efficacité des défenses antioxydantes (Lushchak et al., 2011; Musselman et al., 2011). Le microbiote pourrait endiguer ces effets néfastes, que ce soit en consommant directement les sucres du substrat (Huang et Douglas, 2015), ou en réduisant leur quantité dans le milieu via la production d'acide acétique (Johnston et al., 2010; Ridley et al., 2012).

En parallèle des changements développementaux, nous avons confirmé l'effet du microbiote sur le métabolisme énergétique, par le biais de la modification des carbohydrates de réserve (glycogène) et circulants (glucose) (article 2). Conformément à une large part de la littérature, nous avons

observé des réserves de glycogène ainsi qu'une glycémie plus importantes chez les individus axéniques lorsqu'ils sont confrontés à un milieu pauvre (Ridley et al., 2012; Shin et al., 2011; Wong et al., 2014). De façon intrigante, en milieu pauvre en levures mais riche en sucres, les individus axéniques ont présenté des réponses inverses : ils contenaient significativement moins de glucose que les individus conventionnels. Nos résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence le ou les mécanismes qui sont à l'origine de ces phénomènes, mais permettent de mettre de côté les pistes infructueuses. En effet, ni la consommation alimentaire, ni la préférence alimentaire, ni le taux métabolique n'ont présenté de variations dépendant du microbiote (article 2). Cela suggère que le microbiote n'agit pas via le comportement de compensation nutritionnelle ou l'utilisation des réserves, mais pourrait plutôt affecter la disponibilité des ressources externes ou la capacité de *D. melanogaster* à capter et accumuler les sucres. Ces hypothèses sont vraisemblables dans la mesure où les bactéries (majoritairement du genre *Acetobacter*) métabolisent le glucose pour leur propre énergie, et sont capables de produire la riboflavine, une vitamine B qui peut perturber le métabolisme énergétique lorsqu'elle est absente (Wong et al., 2014). De plus, les voies de régulation de la croissance (IGF et TOR), largement influencées par la présence des bactéries (Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011), tendent à augmenter les taux du glucose lorsqu'elles sont réprimées (Teleman, 2009). Il est possible, et même probable, que tous ces effets réagissent différemment en fonction de la composition du substrat, et particulièrement en présence de grandes quantités de sucre, ce qui expliquerait la divergence de réponse observée entre milieux globalement pauvres et milieux pauvres en levures mais riches en sucres.

1.3.2. Microbiote intestinal et tolérance aux stress

L'exposition des insectes aux contraintes nutritionnelles peut grandement modifier leurs traits d'histoire de vie et plus généralement leur métabolisme. Dans la partie 1.1 de cette discussion nous avons décrit un certain nombre de relations entre nutrition et tolérance au stress, puis dans la partie 1.2 nous avons mis en avant l'importance de la nutrition pour définir la communauté du microbiote intestinal, et enfin dans la partie 1.3.1 nous avons mis en évidence comment le microbiote intestinal pourrait intervenir pour modifier le phénotype nutritionnel. A la lumière de ces observations, il est donc légitime de se demander 1) si le microbiote intestinal occupe une place dans la tolérance au stress (Soen, 2014), et 2) dans le cas où il occupe une telle place, s'il agit à travers l'altération du phénotype nutritionnel ou par des mécanismes indépendants de la nutrition.

Dans un premier temps, nous avons cherché à répondre au premier point, en comparant les performances de mouches adultes axéniques à leurs équivalents conventionnels dans des conditions de stress thermique (chaud et froid) (article 1). Nous n'avons pas détecté d'effet fort du microbiote sur le stress chaud. Cependant, nous avons observé une sensibilité accrue et répétable des individus

axéniques face au stress froid, que ce soit en termes de survie après un stress aigu, ou en capacité de récupération après un stress plus modéré. Ce résultat constitue une avancée appréciable, car jusqu'ici l'attention a été majoritairement dirigée sur l'effet des endosymbiontes sur la tolérance au chaud des pucerons (Montllor et al., 2002; Russell et Moran, 2006). Dans le cas de ces endosymbiontes, la diminution de performance de l'hôte résulte principalement de l'effet négatif de la chaleur sur la survie de certains symbiontes ou même certains génotypes particuliers de symbiontes (Dunbar et al., 2007). Ici, c'est donc le microbiote qui est principalement affecté par le stress et qui, collatéralement, va affecter l'hôte. La température peut aussi affecter le microbiote intestinal des insectes (Ferguson et al., 2018; Moghadam et al., 2018), avec des conséquences pour le moment encore hypothétiques sur la tolérance au stress de l'hôte. Toutefois, nous pouvons nous attendre à ce que, en amont du stress, les changements développementaux liés à la composition et l'abondance des microorganismes touchent la physiologie de l'hôte et modifient constitutivement sa tolérance au stress. Par exemple, il est clairement établi que la perte d'homéostasie au niveau de l'épithélium intestinal est une cause majeure de dommages liés au stress froid chez les insectes (MacMillan et al., 2017; Overgaard et MacMillan, 2017). Or, il a été montré que les bactéries intestinales sont capables d'influencer les conditions d'acidité du tube digestif, avec des conséquences importantes sur l'activité des pompes ioniques (Na^+/K^+) et donc sur l'homéostasie du tube digestif (Overend et al., 2016). En l'absence de bactéries, l'homéostasie est fragilisée, ce qui pourrait limiter la tolérance au stress froid. Le microbiote est également capable d'affecter l'expression de gènes chez l'hôte, dont les gènes impliqués dans la réponse au stress (Broderick et al., 2014). Il est donc envisageable que la suppression du microbiote perturbe l'hôte et réduise globalement ses performances face au stress.

Après avoir vérifié l'effet du microbiote sur la tolérance thermique, nous avons voulu dans un deuxième temps observer comment la nutrition pouvait moduler cet effet (article 2). Tout comme dans l'article 1, la tolérance au stress chaud n'a pas été affectée par le microbiote intestinal, et ce, quelle que soit la composition du substrat nutritionnel. Cela n'est pas très surprenant et reflète la faible plasticité de ce trait chez *D. melanogaster* (Sørensen et al., 2016). Pour le froid cependant, nous avons été doublement surpris par les résultats : non seulement les effets du microbiote semblent indépendants de la nutrition, mais en plus nous avons trouvé que la tolérance au froid des individus au microbiote altéré était supérieure à celle des individus conventionnels. Plusieurs différences méthodologiques peuvent expliquer ces résultats. Bien que la survie au stress aigu soit mesurée de la même façon dans les deux expériences, la récupération après un coma thermique (*chill coma recovery*, mesurée dans l'article 1) dépend de facteurs physiologiques très différents de la perte de mouvement coordonné induite par la température (CT_{min} , mesurée dans l'article 2) (Andersen et al., 2018). De plus, nous n'avons pas strictement utilisé la même technique pour supprimer le microbiote. Dans l'article 1, nous avons élevé les individus dans des conditions

stériles, tandis que dans l'article 2, nous avons utilisé des antibiotiques pour parvenir à altérer le microbiote. Le débat sur l'efficacité de ces deux techniques à supprimer le microbiote sans affecter d'autres traits de l'individu est loin d'être tranché (Heys et al., 2018a; Ridley et al., 2013), mais nos résultats indiquent clairement une divergence entre leurs effets respectifs. En particulier, le traitement antibiotique, bien qu'efficace à supprimer les bactéries, a augmenté la quantité de levures associées au tube digestif des mouches (ce qui n'est pas le cas pour la technique d'élevage stérile). Cet effet inattendu fournit une piste intéressante d'explications pour nos résultats. Les levures constituent en effet une part importante du microbiote chez *D. melanogaster*, avec des fonctions dans le comportement, l'alimentation, ou encore l'immunité (Anagnostou et al., 2010; Broderick et Lemaitre, 2012; Hoang et al., 2015). Elles reçoivent pourtant peu d'attention en tant que membres du microbiote comparativement aux bactéries (Broderick et Lemaitre, 2012; Stefanini, 2018). Plusieurs articles ont mis en évidence le rôle des levures, et plus précisément des levures vivantes dans l'amélioration de la survie au froid (Colinet and Renault, 2014; Le Bourg, 2010a; Le Bourg et al., 2015; Le Rohellec and Le Bourg, 2009). L'hypothèse avancée par Colinet et Renault (2014) est que la présence de levures constitue un apport de nutriments essentiels (lipides et acide aminés) permettant la mise en place de réserves plus importantes, avantageuses contre le froid (Andersen et al., 2010a; Sisodia et Singh, 2012). Toutefois, le fait que dans nos expériences les levures semblent améliorer le CT_{min} alors que dans le même temps aucun effet de l'alimentation n'est observé suggère que leur action ne se limite pas à servir de substrat nutritionnel, mais qu'elles interagissent probablement en tant que « vrais » membres du microbiote, et non en tant que simples passagers dans le tube digestif (article 2). Cette hypothèse va dans le sens de travaux récents, montrant l'amélioration de la tolérance au froid de *D. melanogaster* permise par l'association avec des levures spécifiques, uniquement lorsque ces dernières sont vivantes (Jiménez Padilla, 2016).

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet du microbiote sur la tolérance à la dessiccation. Néanmoins, nous attendions une amélioration de la tolérance à la dessiccation uniquement dans le cas où les mouches au microbiote altéré présenteraient une augmentation des réserves lipidiques (Ballard et al., 2008; Gibbs et al., 1997; Hoffmann et Harshman, 1999). N'ayant pas observé cet effet sur le contenu lipidique, il n'est pas étonnant de ne pas non plus observer de tolérance au stress. Concernant la tolérance au jeûne, nous avons trouvé qu'elle pouvait être significativement réduite par l'altération du microbiote, et notamment en conditions nutritionnelles riches (à la fois en sucres et levures). Cette réponse est difficile à interpréter, car l'ensemble des effets du microbiote ne se manifeste que sur les alimentations pauvres ou déséquilibrées, mais jamais sur les alimentations riches (cf partie 1.3.1). Il n'est pas impossible que cet effet dépende de modifications physiologiques induites par le microbiote que nous n'avons pas mesuré, et de nouvelles études seraient donc nécessaires pour dresser un bilan plus complet des conséquences des interactions nutrition-microbiote.

2. Perspectives et futures directions de recherche

2.1. Le futur des interactions nutrition-microbiote : quelles directions pour mieux comprendre les phénotypes ?

Ces dernières années ont vu naître une quantité incroyable de travaux dédiés aux effets des bactéries sur les macroorganismes (McFall-Ngai et al., 2013). La diversité des relations et de leurs effets est telle qu'il semble aujourd'hui inconcevable de les ignorer pour revenir à un modèle individu-centré (Douglas, 2015; McFall-Ngai et al., 2013). Une des questions centrales en écologie est de comprendre comment les organismes répondent et s'adaptent aux nouvelles contraintes environnementales, thermiques notamment (Bale et Hayward, 2010; Estay et al., 2014), et les aspects liés au microbiote pourraient constituer une part significative de la réponse (Antwis et al., 2017).

2.1.1. Les interactions nutrition-microbiote modulent la plasticité développementale et la tolérance au stress

Un des résultats les plus importants de cette thèse est que le microbiote intestinal peut affecter la tolérance au stress chez *D. melanogaster*, c'est-à-dire que la composition en microorganismes dans le tube digestif pendant le développement d'un individu va le prédisposer ou non à tolérer un stress. Cependant, nos résultats ne sont pas aussi clairs que nous aurions pu l'espérer, puisque nous avons observé à la fois des effets positifs et négatifs suite à l'élimination du microbiote intestinal. Une des hypothèses qui ont motivé le sujet de cette thèse était justement qu'une variabilité des effets du microbiote pouvait émerger grâce à la diversité des facteurs alimentaires (Wong et al., 2014). C'est précisément ce que nous avons constaté pour plusieurs traits phénotypiques et physiologiques (développement, réserves énergétiques...), mais ce n'est pas ce qui ressort pour la tolérance thermique. Il est possible que le fait d'utiliser des mesures différentes de la tolérance au stress soit en partie responsable de la divergence des réponses, mais dans ce cas il est tout de même nécessaire d'identifier pourquoi deux mesures supposées similaires répondent aussi différemment. Dans la partie 1.3.2 nous suggérons que les levures (présentes dans le cas où la tolérance au froid est améliorée et absentes dans le cas inverse) constituent une piste prioritaire à explorer, soutenue par quelques travaux antérieurs (Colinet et Renault, 2014; Le Bourg, 2010a; Le Bourg et al., 2015). Ces levures pourraient modifier les apports en acides aminés essentiels (Yamada et al., 2015), et induire des changements développementaux en activant ou non les voies signalétiques de croissance, sensibles aux nutriments (Koyama et al., 2013), avec *in fine* des conséquences sur la tolérance au stress (Rion et Kawecki, 2007). La stratégie idéale pour tester cette hypothèse serait de comparer

les performances d'individus axéniques à celles d'individus gnotobiotiques réinoculés à partir de souches de levures (et de bactéries pour explorer autant de possibilités que possible) isolées des tubes digestifs des mouches (Ma et al., 2015). C'est un travail que nous avons débuté, mais qui est techniquement exigeant car toutes les souches n'interagissent pas nécessairement avec l'hôte, ni ne sont capables de persister dans leur tube digestif (Hoang et al., 2015; Jiménez Padilla, 2016). Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae* est encore souvent utilisée comme modèle de champignon du microbiote (Ha et al., 2009), alors qu'elle est quasiment absente du tube digestif de *D. melanogaster*, et ne représente jamais plus qu'un aliment transitoire (Hoang et al., 2015), contrairement à certaines espèces de levures associées aux mouches sauvages (Jiménez Padilla, 2016).

Lors de cette thèse nous sommes parvenus à relier de façon assez satisfaisante les variations de tolérance au stress aux modifications physiologiques générées par l'alimentation, avec des résultats qui sont généralement cohérents avec les connaissances préexistantes (teneur en carbohydrates, rythme métabolique...) (Overgaard et MacMillan, 2017; Overgaard et al., 2007; Teets et Denlinger, 2013). Des points restent bien sûr à éclaircir, notamment vis-à-vis de la surpopulation. Par exemple, il serait intéressant de pouvoir mesurer les concentrations en macronutriments et en calories restant dans le substrat nutritif après le développement de larves à différentes densités, et ainsi proposer une analyse proche de la nutrition géométrique mais dans le cadre de la surpopulation. Il est vraisemblable que les larves digèrent préférentiellement les levures, puis se rabattent ensuite sur les sucres lorsque les levures sont épuisées dans le substrat (Fanson et al., 2012). Dans un tel cas, cela signifierait que la surpopulation entraîne un déséquilibre nutritionnel, ce qui changerait la perception que nous avons de cette contrainte. La disparité dans la qualité des ressources consommées, potentiellement liée à une surpopulation et/ou à la présence de levures en abondance pourrait expliquer certaines observations phénotypiques faites sur les *Drosophiles* en milieu naturel. Par exemple, la variabilité extrême de la taille des *Drosophiles* sauvages lorsqu'elles sont récupérées sur des fruits en décomposition, pourrait s'expliquer par des contraintes de ce type.

Contrairement à l'alimentation, peu d'éléments dans nos résultats permettent de relier d'éventuels changements physiologiques dus au microbiote avec les phénotypes de tolérance au stress. Pour la tolérance au stress, nous avons observé des effets du microbiote majoritairement indépendants de l'alimentation, tandis que les effets physiologiques et développementaux étaient souvent dissemblables en fonction de la concentration en levures ou en sucres du substrat. Utiliser des approches de métabolomique et de transcriptomique pour comparer des individus axéniques et conventionnels permettrait de dresser un bilan plus complet des effets du microbiote (Ma et al., 2015; van Baarlen et al., 2013) et peut être fournirait des résultats pouvant être comparés à ceux de la littérature de la tolérance thermique. Il serait également intéressant de pouvoir comparer l'importance du mode de vie et de reproduction des organismes sur la diversité de leurs microbiotes

et sur les bénéfiques qu'ils tirent de la relation avec ces microorganismes en conditions naturelles. Par exemple, *D. melanogaster* se développe sur des fruits en décomposition, chargés en levures, mais *D. suzukii* préfère des fruits encore intacts et relativement préservés de la colonisation par les microorganismes (Chandler et al., 2014). Il est donc envisageable que les protéines soient un élément limitant de la croissance de *D. suzukii*, mais affectent moins *D. melanogaster*. C'est typiquement ce qui est suggéré par la dépendance vitale aux bactéries de *D. suzukii* pour se développer sur les fruits les plus pauvres en protéines (Bing et al., 2018).

2.1.2. Quand l'environnement façonne le microbiote

Jusqu'ici, nous nous sommes beaucoup intéressés aux effets développementaux et constitutifs du microbiote sur la thermotolérance de l'hôte. Une autre façon d'aborder le sujet « microbiote-tolérance thermique » consiste à s'intéresser aux effets du stress sur le microbiote lui-même (Carey et Duddleston, 2014). Entre le début et la fin de cette thèse, beaucoup de travaux ont été publiés sur la thématique de la relation stress-microbiote, pour des taxons aussi variés que les mammifères (Kock et al., 2018), les amphibiens (Robak et Richards-Zawacki, 2018; Wiebler et al., 2018), les lézards (Bestion et al., 2017), les coraux (Ziegler et al., 2017) et les insectes (Ferguson et al., 2018; Moghadam et al., 2018). Dans ces études, la température agit sur le microbiote intestinal et provoque parfois des modifications phénotypiques à même de changer la performance de l'organisme hôte. Ces analyses de données d'animaux de terrain restent souvent descriptives, et gagneraient beaucoup à être complétées par des approches expérimentales. Par exemple, les manipulations de transplantation de microbiote sont des techniques prometteuses qui pourraient permettre de dresser des liens solides de cause à effet entre microbiote et phénotype (Moghadam et al., 2018). C'est ce que nous avons commencé à mettre en place, avec la transplantation de microbiotes issus de lignées de *D. melanogaster* élevées à basse température dans des lignées élevées à haute température. Pour des raisons de problèmes matériels, l'expérience n'est pas arrivée à son terme, mais elle pourrait être réitérée et nous informer sur l'importance des phénomènes de sélection/évolution sur le microbiote, découplés de l'acclimatation/évolution de l'hôte. Ce type de résultat est nécessaire, car l'ensemble des idées proposées par Soen (2014) sur l'effet tampon du microbiote, la dysbiose induite par le stress, ou encore l'adaptation rapide du microbiote à l'environnement (plus rapide que celle de l'hôte à l'environnement) sont des idées intéressantes mais qui avant tout doivent être testées pour pouvoir être discutées sur la base de constats empiriques.

En dehors des effets du stress, l'environnement peut agir sur le microbiote essentiellement par le biais de l'alimentation (Winans et al., 2017; Wong et al., 2015b). Comme discuté dans l'article 4 notamment, les facteurs qui dictent la structure et la diversité du microbiote sont encore flous. Pour être plus précis, si nous avons une assez bonne idée des facteurs qui peuvent régir la structure du microbiote (Adair et al., 2018; Martinson et al., 2017), nous ne savons pas quelle importance

relative chacun d'entre eux possède. Est-ce que les microorganismes sont transitoires dans le tube digestif et l'assemblage du microbiote résulte-t-il d'évènements stochastiques (Obadia et al., 2017) ? Est-ce que les membres que l'on retrouve souvent associés aux mouches (*Acetobacteraceae* et *Lactobacillales*) sont le résultat d'une coévolution avec l'hôte, ou avec le substrat (Martino et al., 2018) ? A quel point l'hôte est-il capable de favoriser activement certains microorganismes (Storelli et al., 2018) ? Nos résultats ainsi que ceux de Winans et al. (2017) suggèrent que, au moins au stade larvaire, l'activité d'excrétion azotée peut largement façonner la communauté microbienne extérieure, mais que la communauté interne résiste bien à ces changements. Comme présenté dans la figure 1, beaucoup d'interrogations majeures sur les relations alimentation-microbiote et microbiote-microorganismes environnementaux freinent encore notre compréhension globale du système holobionte-environnement.

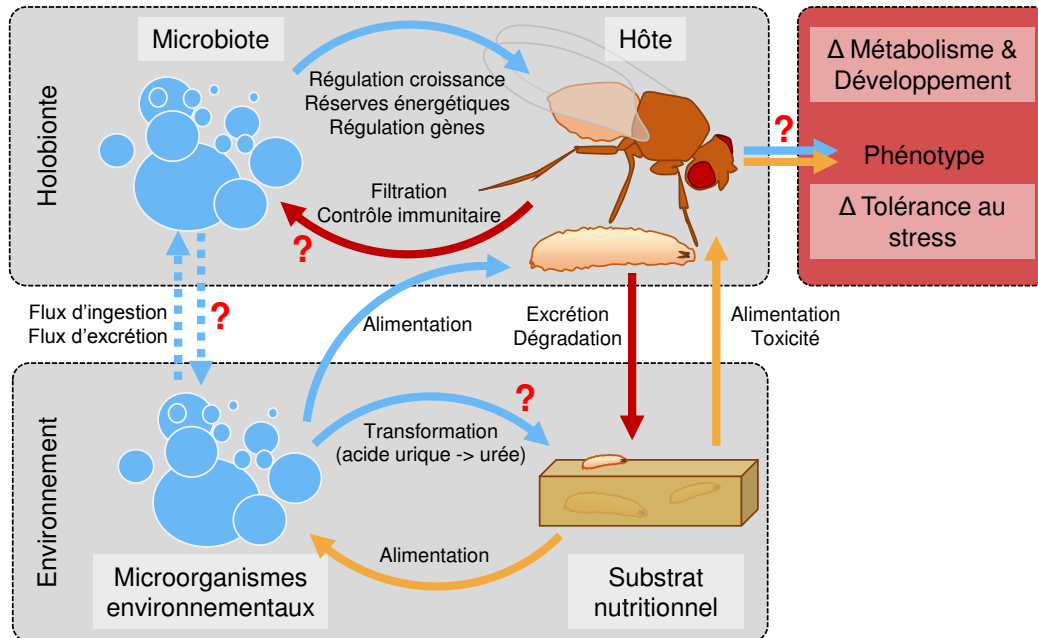


Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'interaction tripartite hôte-nutrition-microbiote. Les flèches de couleur représentent l'action de l'hôte (rouge), de la nutrition (orange), et du microbiote (bleu). Les points d'interrogations sont placés sur les relations qui sont encore aujourd'hui particulièrement peu claires et/ou délaissées, et qui (selon moi) mériteraient de nouveaux travaux à l'avenir.

2.2. Se détacher de l'individu pour explorer des échelles différentes

Mon travail lors de cette thèse a été centré sur l'échelle de l'individu. Nous avons observé divers effets intéressants, que ce soit sur le développement, la tolérance au stress, le comportement, ou les fluctuations des communautés microbiennes des individus. Cependant, ces observations soulèvent aussi beaucoup de questions sur les mécanismes (cellulaires et moléculaires) derrière les effets

individuels, et laissent également la question des conséquences écologiques à l'échelle des populations ou des écosystèmes en suspens.

2.2.1. Voir plus petit

Dans la relation hôte-microbiote, l'hôte représente à lui tout seul un écosystème de microorganismes (Douglas et Werren, 2016). Par conséquent, comme en macroécologie, l'assemblage des espèces au sein du paysage intestinal peut avoir un rôle tout aussi décisif que la présence ponctuelle d'une espèce particulière (Cardinale et al., 2002). Par exemple, la présence d'une levure peut être sans effet sur l'hôte, mais favoriser la présence d'une *Lactobacille* qui elle possède une importance fonctionnelle directe pour l'hôte. Cet exemple n'est d'ailleurs pas pris au hasard, puisque ce genre de relation inter-microorganisme est déjà retrouvé dans des contextes hors microbiote (Ponomarova et al., 2017). Caractériser les relations entre microorganismes est complexe, mais des approches simplifiées et impliquant un nombre restreint d'espèces constitueraient déjà un premier pas. L'intérêt serait par exemple de comprendre pourquoi les genres *Lactobacillus* et *Acetobacter* tendent à s'exclure mutuellement chez *D. melanogaster* (Newell et Douglas, 2014).

Le microenvironnement du tube digestif est marqué par les interactions entre espèces, mais il est aussi caractérisé par des conditions environnementales particulières. Ainsi, poursuivre les travaux d'Overend et al. (2016) afin de comprendre les processus métaboliques qui permettent la régulation de l'équilibre acido-basique et de l'homéostasie de l'épithélium intestinal par les bactéries constituerait une vraie avancée. Cela semble d'autant plus pertinent que le lien entre homéostasie de l'épithélium et tolérance au froid est extrêmement fort (MacMillan et al., 2017).

Enfin, les mécanismes moléculaires qui régissent les effets du microbiote sur le développement sont assez bien caractérisés (Erkosar et al., 2013; Storelli et al., 2011), mais tout ou presque reste à faire pour ce qui est de la tolérance au stress. La régulation des gènes de la *Drosophile* sous l'influence du microbiote constitue une piste prometteuse pour comprendre les modifications phénotypiques engendrées par le microbiote (Broderick et al., 2014; Buchon et al., 2009; Combe et al., 2014; Ryu et al., 2008). Sachant que le microbiote peut en particulier augmenter l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress (Broderick et al., 2014), il est possible de faire l'hypothèse que ces variations aient des conséquences fonctionnelles, notamment vis-à-vis de la tolérance au froid. Afin de pouvoir décrire une vraie relation de cause à effet, il serait nécessaire d'examiner l'expression de gènes d'individus axéniques ou non, après l'exposition au stress. Des analyses de transcriptomique, ou l'utilisation de lignées de *Drosophiles* aux gènes éteints (lignées mutantes, ou RNAi) codant pour certaines fonctions d'intérêt (HSP non constitutives, enzymes antioxydantes...) permettraient également d'aller plus loin sur cette voie.

2.2.2. Voir plus grand

Que ce soit au travers de cette thèse ou dans la littérature préexistante, une grande diversité d'effets individuels de la nutrition, du microbiote, ou de leur combinaison est observée. Ces effets pourraient avoir des répercussions en termes d'évolution, ou de dynamique des populations, mais les études portant sur ces questions manquent, car il est toujours difficile de transposer des résultats individuels à des échelles (temporelles ou spatiales) plus importantes (Gibert et al., 2015). Pour la surpopulation, nous nous sommes posé la question de la valeur adaptative des individus issus de milieux très surpeuplés. Nous avons procédé à des expériences préliminaires de croisements afin de tester l'effet de la densité larvaire maternelle sur la génération suivante (fig. 2). Il s'avère que le temps de développement est augmenté d'une demi-journée (fig. 2A et B), que le délai avant maturité sexuelle est nettement allongé (observation personnelle), et que la masse est réduite (pour les femelles uniquement, fig. 2E et F) pour les individus issus de femelles élevées en haute densité. Cela suggère qu'un stress comme la surpopulation peut générer des effets transgénérationnels, affectant les traits d'histoire des individus et par conséquent leur valeur sélective (Byrne et Rice, 2006).

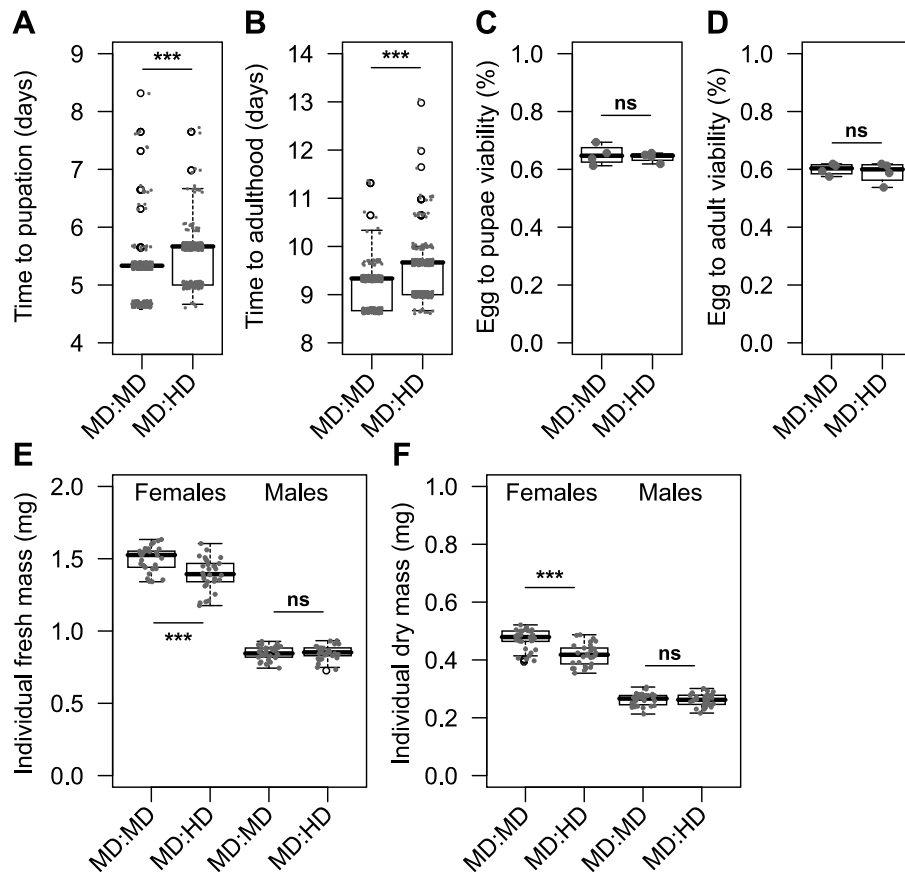


Figure 2 : Effet transgénérationnel de la surpopulation larvaire. Pour l'ensemble des traits, l'effet maternel est testé en comparant des descendants issus de deux croisements : mâles moyenne densité [MD] x femelles moyenne densité [MD] ou mâles moyenne densité [MD] x femelles haute densité [HD]. (A) et (B) Temps de développement jusqu'aux stades pupes et adulte. Points : événements individuels de pupation ou d'émergence. (C) et (D) Viabilité des œufs déposés jusqu'aux stades pupes et adulte respectivement. Points : pourcentage de viabilité par tube (N=4). (E) et (F) Respectivement les masses fraîches et sèches des adultes femelles et mâles. Pour l'ensemble des graphiques, les boîtes représentent les premiers et troisièmes quartiles, et la ligne noire horizontale la médiane de la distribution. * indique une différence significative ($p < 0.001$).**

Les problématiques liées au microbiote gagneraient aussi beaucoup à être analysées sous l'angle des effets transgénérationnels. Savoir la proportion du microbiote à être transmise d'une génération à la suivante est une information qui manque encore cruellement par exemple. De la même façon, nous savons encore peu de choses sur la variabilité du microbiote au sein des populations. Souvent, le microbiote est implicitement considéré comme homogène entre les individus (Douglas, 2018). C'est probablement le cas dans un environnement de laboratoire, mais il est possible que les individus sauvages ne suivent pas cette règle (Douglas, 2018). Enfin, il semblerait que la biogéographie des populations d'insectes contraigne en partie les communautés de microorganismes qui leur sont associées (Behar et al., 2008), ce qui soulève des questions sur le caractère adaptatif ou opportuniste des associations hôte-microbiote.

2.3. Conclusions

Au cours de cette thèse, nous avons montré que le développement et le phénotype de *D. melanogaster* sont extrêmement plastiques, et répondent fortement à la fois aux contraintes nutritionnelles et aux variations du microbiote intestinal. Nous avons constaté que le plus souvent la nutrition possède un impact quantitativement plus important que le microbiote, mais néanmoins, tous deux conditionnent le phénotype en s'influençant mutuellement. Ainsi, l'effet du microbiote peut complètement changer selon l'alimentation, et inversement l'effet de l'alimentation peut être compensé ou non en fonction du microbiote. La tolérance au stress représente un aspect important du phénotype des insectes, particulièrement sensible à cette interaction. Les mécanismes moléculaires responsables des phénotypes tolérants ou sensibles au stress ne sont pas encore complètement identifiés, mais nos travaux permettent de mettre de côté certaines hypothèses et d'en privilégier d'autres. Explorer ces questions pourrait permettre de mieux appréhender la façon dont les insectes évoluent dans un environnement dynamique et qui leur est parfois défavorable. Notamment, comprendre pourquoi telle alimentation ou telle composition du microbiote influencent le phénotype de l'insecte tandis que telles autres non, représente une opportunité pour faire la lumière sur les mécanismes à la base de la plasticité phénotypique.

Références

- Abu, F., Wang, J. G., Oh, Y., Deng, J., Neubert, T. A. and Suh, G. S. B.** (2018). Communicating the nutritional value of sugar in *Drosophila*. *PNAS* **115**, E2829–E2838.
- Adair, K. L., Wilson, M., Bost, A. and Douglas, A. E.** (2018). Microbial community assembly in wild populations of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *The ISME Journal* **12**, 959–972.
- Adamo, S. A.** (2010). Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior, and Immunity* **24**, 194–200.
- Afkhami, M. E., Rudgers, J. A. and Stachowicz, J. J.** (2014). Multiple mutualist effects: conflict and synergy in multispecies mutualisms. *Ecology* **95**, 833–844.
- Agrawal, A. A.** (2001). Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* **294**, 321–326.
- Agrawal, A. A., Conner, J. K., Johnson, M. T. J. and Wallsgrove, R.** (2002). Ecological Genetics of an Induced Plant Defense Against Herbivores: Additive Genetic Variance and Costs of Phenotypic Plasticity. *Evolution* **56**, 2206–2213.
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M. and Aksoy, S.** (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.* **32**, 402–407.
- Anagnostou, C., Dorsch, M. and Rohlf, M.** (2010). Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **136**, 1–11.
- Anbutsu, H., Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., Futahashi, R., Tanahashi, M., Meng, X.-Y., Kuriwada, T., Mori, N., Oshima, K., et al.** (2017). Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles. *PNAS* **114**, E8382–E8391.
- Andersen, L. H., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., Toft, S. and Mayntz, D.** (2010). Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **56**, 336–340.
- Andersen, J. L., Manenti, T., Sørensen, J. G., MacMillan, H. A., Loeschcke, V. and Overgaard, J.** (2015). How to assess *Drosophila* cold tolerance: chill coma temperature and lower lethal temperature are the best predictors of cold distribution limits. *Functional Ecology* **29**, 55–65.
- Andersen, M. K., Folkersen, R., MacMillan, H. A. and Overgaard, J.** (2016). Cold-acclimation improves chill tolerance in the migratory locust through preservation of ion balance and membrane potential. *Journal of Experimental Biology* jeb.150813.
- Andersen, M. K., Jensen, N. J. S., Robertson, R. M. and Overgaard, J.** (2018). Central nervous shutdown underlies acute cold tolerance in tropical and temperate *Drosophila* species. *Journal of Experimental Biology* jeb.179598.
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E. and McArdle, B. H.** (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters* **9**, 683–693.

- Angilletta Jr., M. J.** (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford University Press.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C. and Lei, W.** (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *AJAR* **6**, 2026–2032.
- Antwis, R. E., Griffiths, S. M., Harrison, X. A., Aranega-Bou, P., Arce, A., Bettridge, A. S., Brailsford, F. L., de Menezes, A., Devaynes, A., Forbes, K. M., et al.** (2017). Fifty important research questions in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **93**.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.
- Apidianakis, Y. and Rahme, L. G.** (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nature Protocols* **4**, 1285–1294.
- Arias, L. N., Sambucetti, P., Scannapieco, A. C., Loeschcke, V. and Norry, F. M.** (2012). Survival of heat stress with and without heat hardening in *Drosophila melanogaster*: interactions with larval density. *Journal of Experimental Biology* **215**, 2220–2225.
- Arrese, E. L. and Soulages, J. L.** (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology* **55**, 207–225.
- Arsham, A. M. and Neufeld, T. P.** (2006). Thinking globally and acting locally with TOR. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 589–597.
- Atkinson, W. D.** (1979). A Field Investigation of Larval Competition in Domestic *Drosophila*. *Journal of Animal Ecology* **48**, 91–102.
- Auchtung, T. A., Fofanova, T. Y., Stewart, C. J., Nash, A. K., Wong, M. C., Gesell, J. R., Auchtung, J. M., Ajami, N. J. and Petrosino, J. F.** (2018). Investigating Colonization of the Healthy Adult Gastrointestinal Tract by Fungi. *mSphere* **3**.
- Auld, J. R., Agrawal, A. A. and Relyea, R. A.** (2010). Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **277**, 503–511.
- Bachrach, U.** (1957). The aerobic breakdown of uric acid by certain pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* **17**, 1–11.
- Bale, J. S.** (1993). Classes of Insect Cold Hardiness. *Functional Ecology* **7**, 751–753.
- Bale, J. S. and Hayward, S. a. L.** (2010). Insect overwintering in a changing climate. *Journal of Experimental Biology* **213**, 980–994.
- Bale, J. S., Masters, G. J., Hodkinson, I. D., Awmack, C., Bezemer, T. M., Brown, V. K., Butterfield, J., Buse, A., Coulson, J. C., Farrar, J., et al.** (2002). Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology* **8**, 1–16.
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G. and Simpson, S. J.** (2008). Starvation resistance is positively correlated with body lipid proportion in five wild caught *Drosophila simulans* populations. *Journal of Insect Physiology* **54**, 1371–1376.

- Barata, A., Santos, S. C., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V.** (2012). New insights into the ecological interaction between grape berry microorganisms and *Drosophila* flies during the development of sour rot. *Microb. Ecol.* **64**, 416–430.
- Barja, G.** (2007). Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res* **10**, 215–224.
- Barker, J. S. F.** (1973). Adult population density, fecundity and productivity in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Oecologia* **11**, 83–92.
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C.-Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A. and Clark, M. A.** (1995). Genetics, Physiology, and Evolutionary Relationships of the Genus *Buchnera*: Intracellular Symbionts of Aphids. *Annual Review of Microbiology* **49**, 55–94.
- Begon, M., Townsend, C. R. and Harper, J. L.** (2005). *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. 4th Edition. Malden, MA: John Wiley & Sons.
- Běhal, V.** (2000). Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* **47**, 113–156.
- Behar, A., Yuval, B. and Jurkevitch, E.** (2005). Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol. Ecol.* **14**, 2637–2643.
- Behar, A., Yuval, B. and Jurkevitch, E.** (2008). Community Structure of the Mediterranean Fruit Fly Microbiota: Seasonal and Spatial Sources of Variation. *Israel Journal of Ecology & Evolution* **54**, 181–191.
- Belloni, V., Galeazzi, A., Bernini, G., Mandrioli, M., Versace, E. and Haase, A.** (2018). Evolutionary compromises to metabolic toxins: Ammonia and urea tolerance in *Drosophila suzukii* and *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Behav.* **191**, 146–154.
- Bennion, B. J. and Daggett, V.** (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *PNAS* **100**, 5142–5147.
- Bestion, E., Jacob, S., Zinger, L., Gesu, L. D., Richard, M., White, J. and Cote, J.** (2017). Climate warming reduces gut microbiota diversity in a vertebrate ectotherm. *Nature Ecology & Evolution* **1**, 0161.
- Bijlsma, R. and Loeschcke, V.** (2005). Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 744–749.
- Bing, X., Gerlach, J., Loeb, G. and Buchon, N.** (2018). Nutrient-Dependent Impact of Microbes on *Drosophila suzukii* Development. *mBio* **9**, e02199-17.
- Blatch, S. A., Meyer, K. W. and Harrison, J. F.** (2010). Effects of dietary folic acid level and symbiotic folate production on fitness and development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* **4**, 312–319.
- Blum, J. E., Fischer, C. N., Miles, J. and Handelsman, J.** (2013). Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *MBio* **4**, e00860-00813.
- Boettcher, K. J., Ruby, E. G. and McFall-Ngai, M. J.** (1996). Bioluminescence in the symbiotic squid *Euprymna scolopes* is controlled by a daily biological rhythm. *J Comp Physiol A* **179**, 65–73.

- Boggs, C. L.** (2009). Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology* **23**, 27–37.
- Borash, D. J. and Ho, G. T.** (2001). Patterns of selection: stress resistance and energy storage in density-dependent populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **47**, 1349–1356.
- Borash, D. J., Gibbs, A. G., Joshi, A. and Mueller, L. D.** (1998). A Genetic Polymorphism Maintained by Natural Selection in a Temporally Varying Environment. *The American Naturalist* **151**, 148–156.
- Borash, Teotónio, Rose and Mueller** (2000). Density-dependent natural selection in *Drosophila*: correlations between feeding rate, development time and viability. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 181–187.
- Bosch, T. C. G. and McFall-Ngai, M. J.** (2011). Metaorganisms as the new frontier. *Zoology* **114**, 185–190.
- Botella, L. M., Moya, A., González, M. C. and Ménsua, J. L.** (1985). Larval stop, delayed development and survival in overcrowded cultures of *Drosophila melanogaster*: Effect of urea and uric acid. *Journal of Insect Physiology* **31**, 179–185.
- Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A. W., Kambhampati, S. and Stern, D. L.** (2003). Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-Buchnera symbiosis. *PLoS Biol.* **1**, E21.
- Brankatschk, M., Gutmann, T., Knittelfelder, O., Palladini, A., Prince, E., Grzybek, M., Brankatschk, B., Shevchenko, A., Coskun, Ü. and Eaton, S.** (2018). A Temperature-Dependent Switch in Feeding Preference Improves *Drosophila* Development and Survival in the Cold. *Dev. Cell* **46**, 781-793.e4.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J. and Cryan, J. F.** (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *PNAS* **108**, 16050–16055.
- Broderick, N. A. and Lemaitre, B.** (2012). Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes* **3**, 307–321.
- Broderick, N. A., Buchon, N. and Lemaitre, B.** (2014). Microbiota-Induced Changes in *Drosophila melanogaster* Host Gene Expression and Gut Morphology. *mBio* **5**, e01117-14.
- Brooks, A. W., Kohl, K. D., Brucker, R. M., Opstal, E. J. van and Bordenstein, S. R.** (2016). Phylosymbiosis: Relationships and Functional Effects of Microbial Communities across Host Evolutionary History. *PLOS Biology* **14**, e2000225.
- Broughton, S. J., Piper, M. D. W., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Driege, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D. J., Leever, S. J., et al.** (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *PNAS* **102**, 3105–3110.
- Brown, A. E., Baumbach, J., Cook, P. E. and Ligoxygakis, P.** (2009). Short-Term Starvation of Immune Deficient *Drosophila* Improves Survival to Gram-Negative Bacterial Infections. *PLOS ONE* **4**, e4490.

- Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A. F. and Benzer, S.** (2004). Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria. *PNAS* **101**, 12974–12979.
- Bubliy, O. A. and Loeschcke, V.** (2005). Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 789–803.
- Bubliy, O. A., Kristensen, T. N., Kellermann, V. and Loeschcke, V.** (2012a). Plastic responses to four environmental stresses and cross-resistance in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* **26**, 245–253.
- Bubliy, O. A., Kristensen, T. N., Kellermann, V. and Loeschcke, V.** (2012b). Humidity affects genetic architecture of heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* **25**, 1180–1188.
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S. and Lemaitre, B.** (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* **23**, 2333–2344.
- Bukau, B. and Horwich, A. L.** (1998). The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* **92**, 351–366.
- Burger, J. M. S., Hwangbo, D. S., Corby-Harris, V. and Promislow, D. E. L.** (2007). The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. *Aging Cell* **6**, 63–71.
- Burke, G., Fiehn, O. and Moran, N.** (2010). Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. *The ISME Journal* **4**, 242–252.
- Bursell, E.** (1967). The Excretion of Nitrogen in Insects. In *Advances in Insect Physiology* (ed. Beament, J. W. L.), Treherne, J. E.), and Wigglesworth, V. B.), pp. 33–67. Academic Press.
- Byrne, P. G. and Rice, W. R.** (2006). Evidence for adaptive male mate choice in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **273**, 917–922.
- Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A.** (2000). Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum Exp Toxicol* **19**, 2–31.
- Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A.** (2002). Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* **21**, 91–97.
- Cani, P. D., Rodrigo, B., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. and Burcelin, R.** (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*.
- Cardinale, B. J., Palmer, M. A. and Collins, S. L.** (2002). Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* **415**, 426–429.
- Carey, H. V. and Duddlestone, K. N.** (2014). Animal-Microbial Symbioses in Changing Environments. *J Therm Biol* **44**, 78–84.
- Caro-Maldonado, A. and Muñoz-Pinedo, C.** (2011). Dying for Something to Eat: How Cells Respond to Starvation. *The Open Cell Signaling Journal* **3**,.

- Carrillo-Araujo, M., Taş, N., Alcántara-Hernández, R. J., Gaona, O., Schondube, J. E., Medellín, R. A., Jansson, J. K. and Falcón, L. I.** (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Front. Microbiol.* **6**,.
- Carvalho, G. B., Kapahi, P. and Benzer, S.** (2005). Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods* **2**, 813–815.
- Carvalho, M., Sampaio, J. L., Palm, W., Brankatschk, M., Eaton, S. and Shevchenko, A.** (2012). Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. *Molecular Systems Biology* **8**, 600.
- Catterson, J. H., Khericha, M., Dyson, M. C., Vincent, A. J., Callard, R., Haveron, S. M., Rajasingam, A., Ahmad, M. and Partridge, L.** (2018). Short-Term, Intermittent Fasting Induces Long-Lasting Gut Health and TOR-Independent Lifespan Extension. *Curr. Biol.* **28**, 1714-1724.e4.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M. and Palmer, T. M.** (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances* **1**, e1400253.
- Ceja-Navarro, J. A., Vega, F. E., Karaoz, U., Hao, Z., Jenkins, S., Lim, H. C., Kosina, P., Infante, F., Northen, T. R. and Brodie, E. L.** (2015). Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature Communications* **6**, 7618.
- Chakir, M., Chafik, A., Moreteau, B., Gibert, P. and David, J. R.** (2002). Male Sterility Thermal Thresholds in *Drosophila*: *D. simulans* Appears More Cold-adapted Than its Sibling *D. melanogaster*. *Genetica* **114**, 195–205.
- Chandler, J. A., Lang, J. M., Bhatnagar, S., Eisen, J. A. and Kopp, A.** (2011). Bacterial Communities of Diverse *Drosophila* Species: Ecological Context of a Host–Microbe Model System. *PLOS Genetics* **7**, e1002272.
- Chandler, J. A., Eisen, J. A. and Kopp, A.** (2012). Yeast communities of diverse *Drosophila* species: comparison of two symbiont groups in the same hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7327–7336.
- Chandler, J. A., James, P. M., Jospin, G. and Lang, J. M.** (2014). The bacterial communities of *Drosophila suzukii* collected from undamaged cherries. *PeerJ* **2**, e474.
- Chapman, P. M.** (2002). Defining hormesis: comments on Calabrese and Baldwin (2002). *Hum Exp Toxicol* **21**, 99–101.
- Chapman, T. and Partridge, L.** (1996). Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc. Biol. Sci.* **263**, 755–759.
- Chaston, J. M., Dobson, A. J., Newell, P. D. and Douglas, A. E.** (2016). Host Genetic Control of the Microbiota Mediates the *Drosophila* Nutritional Phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 671–679.
- Chevin, L.-M., Lande, R. and Mace, G. M.** (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biol.* **8**, e1000357.

- Chippindale, A. K., Leroi, A. M., Kim, S. B. and Rose, M. R.** (1993). Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* **6**, 171–193.
- Chippindale, A. K., Chu, T. J. F. and Rose, M. R.** (1996). Complex Trade-Offs and the Evolution of Starvation Resistance in *Drosophila Melanogaster*. *Evolution* **50**, 753–766.
- Chown, S. L. and Nicolson, S.** (2004). *Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns*. Oxford University Press.
- Chown, S. L., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Jr, M. J. A., Stenseth, N. C. and Pertoldi, C.** (2010). Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Climate Research* **43**, 3–15.
- Clark, M. S. and Worland, M. R.** (2008). How insects survive the cold: molecular mechanisms—a review. *J Comp Physiol B* **178**, 917–933.
- Clegg, J. S.** (2001). Cryptobiosis—a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **128**, 613–624.
- Colinet, H. and Hoffmann, A. A.** (2012). Comparing phenotypic effects and molecular correlates of developmental, gradual and rapid cold acclimation responses in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* **26**, 84–93.
- Colinet, H. and Renault, D.** (2012). Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. *Biology Letters* **8**, 1050–1054.
- Colinet, H. and Renault, D.** (2014). Dietary live yeast alters metabolic profiles, protein biosynthesis and thermal stress tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **170**, 6–14.
- Colinet, H., Larvor, V., Bical, R. and Renault, D.** (2013). Dietary sugars affect cold tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Metabolomics* **9**, 608–622.
- Colinet, H., Sinclair, B. J., Vernon, P. and Renault, D.** (2015). Insects in Fluctuating Thermal Environments. *Annual Review of Entomology* **60**, 123–140.
- Colinet, H., Renault, D., Javal, M., Berková, P., Šimek, P. and Košťál, V.** (2016). Uncovering the benefits of fluctuating thermal regimes on cold tolerance of *Drosophila* flies by combined metabolomic and lipidomic approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 1736–1745.
- Combe, B. E., Defaye, A., Bozonnet, N., Puthier, D., Royet, J. and Leulier, F.** (2014). *Drosophila* Microbiota Modulates Host Metabolic Gene Expression via IMD/NF- κ B Signaling. *PLOS ONE* **9**, e94729.
- Corby-Harris, V., Pontaroli, A. C., Shimkets, L. J., Bennetzen, J. L., Habel, K. E. and Promislow, D. E. L.** (2007). Geographical Distribution and Diversity of Bacteria Associated with Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3470–3479.
- Corrales-Carvajal, V. M., Faisal, A. A. and Ribeiro, C.** (2016). Internal states drive nutrient homeostasis by modulating exploration-exploitation trade-off. *Elife* **5**,.
- Costantini, D.** (2014). *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology*. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Costantini, D., Metcalfe, N. B. and Monaghan, P.** (2010). Ecological processes in a hormetic framework. *Ecology Letters* **13**, 1435–1447.
- Coyte, K. Z., Schluter, J. and Foster, K. R.** (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* **350**, 663–666.
- Crawley, M. J. and Gillman, M. P.** (1989). Population Dynamics of Cinnabar Moth and Ragwort in Grassland. *Journal of Animal Ecology* **58**, 1035–1050.
- Cremer, S. and Heinze, J.** (2003). Stress grows wings: environmental induction of winged dispersal males in *Cardiocondyla* ants. *Curr. Biol.* **13**, 219–223.
- Danks, H. V.** (2007). The elements of seasonal adaptations in insects. *The Canadian Entomologist* **139**, 1–44.
- David, C. L., Pierce, V. A., Aswad, D. W. and Gibbs, A. G.** (1999). The effect of urea exposure on isoaspartyl content and protein l-isoaspartate methyltransferase activity in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **124**, 423–427.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., et al.** (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563.
- Davies, K. J.** (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* **50**, 279–289.
- Davison, A. and Blaxter, M.** (2005). Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1273–1284.
- Denny, M.** (2017). The fallacy of the average: on the ubiquity, utility and continuing novelty of Jensen’s inequality. *Journal of Experimental Biology* **220**, 139–146.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C. and Martin, P. R.** (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *PNAS* **105**, 6668–6672.
- Dillon, R. and Charnley, K.** (2002). Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.* **153**, 503–509.
- Djawdan, M., Chippindale, A. K., Rose, M. R. and Bradley, T. J.** (1998). Metabolic Reserves and Evolved Stress Resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Zoology* **71**, 584–594.
- Dobson, A. J., Chaston, J. M., Newell, P. D., Donahue, L., Hermann, S. L., Sannino, D. R., Westmiller, S., Wong, A. C.-N., Clark, A. G., Lazzaro, B. P., et al.** (2015). Host genetic determinants of microbiota-dependent nutrition revealed by genome-wide analysis of *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications* **6**, 6312.
- Dong, Y., Manfredini, F. and Dimopoulos, G.** (2009). Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLOS Pathogens* **5**, e1000423.
- Douglas, A. E.** (2006). Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J Exp Bot* **57**, 747–754.

- Douglas, A. E.** (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* **23**, 38–47.
- Douglas, A. E.** (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* **60**, 17–34.
- Douglas, A. E.** (2018). The Drosophila model for microbiome research. *Lab Animal* **47**, 157–164.
- Douglas, A. E. and Beard, C. B.** (1996). Microbial symbioses in the midgut of insects. In *Biology of the Insect Midgut* (ed. Lehane, M. J.) and Billingsley, P. F.), pp. 419–431. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Douglas, A. E. and Werren, J. H.** (2016). Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *mBio* **7**, e02099-15.
- Dow, J. a. T. and Davies, S. A.** (2003). Integrative Physiology and Functional Genomics of Epithelial Function in a Genetic Model Organism. *Physiological Reviews* **83**, 687–729.
- Dowd, P. F.** (1992). Insect fungal symbionts: A promising source of detoxifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology* **9**, 149–161.
- Dowling, D. K. and Simmons, L. W.** (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* rspb.2008.1791.
- Dunbar, H. E., Wilson, A. C. C., Ferguson, N. R. and Moran, N. A.** (2007). Aphid Thermal Tolerance Is Governed by a Point Mutation in Bacterial Symbionts. *PLOS Biology* **5**, e96.
- Edgar, B. A.** (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 907–916.
- Edgecomb, R. S., Harth, C. E. and Schneiderman, A. M.** (1994). Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *Journal of Experimental Biology* **197**, 215–235.
- Elser, J.** (2006). Biological Stoichiometry: A Chemical Bridge between Ecosystem Ecology and Evolutionary Biology. *The American Naturalist* **168**, S25–S35.
- Engel, P. and Moran, N. A.** (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 699–735.
- Erkosar, B. and Leulier, F.** (2014). Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model. *FEBS Letters* **588**, 4250–4257.
- Erkosar, B., Storelli, G., Defaye, A. and Leulier, F.** (2013). Host-intestinal microbiota mutualism: “learning on the fly.” *Cell Host Microbe* **13**, 8–14.
- Erkosar, B., Storelli, G., Mitchell, M., Bozonnet, L., Bozonnet, N. and Leulier, F.** (2015). Pathogen Virulence Impedes Mutualist-Mediated Enhancement of Host Juvenile Growth via Inhibition of Protein Digestion. *Cell Host Microbe* **18**, 445–455.
- Erkosar, B., Kolly, S., Meer, J. R. van der and Kawecki, T. J.** (2017). Adaptation to Chronic Nutritional Stress Leads to Reduced Dependence on Microbiota in *Drosophila melanogaster*. *mBio* **8**, e01496-17.

- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S. and Pascal, G.** (2016). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*.
- Estay, S. A., Lima, M. and Bozinovic, F.** (2014). The role of temperature variability on insect performance and population dynamics in a warming world. *Oikos* **123**, 131–140.
- Etienne, R., Fortunat, K. and Pierce, V.** (2001). Mechanisms of urea tolerance in urea-adapted populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **204**, 2699–2707.
- Ezenwa, V. O., Gerardo, N. M., Inouye, D. W., Medina, M. and Xavier, J. B.** (2012). Animal Behavior and the Microbiome. *Science* **338**, 198–199.
- Fanson, B. G., Weldon, C. W., Pérez-Staples, D., Simpson, S. J. and Taylor, P. W.** (2009). Nutrients, not caloric restriction, extend lifespan in Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*). *Aging Cell* **8**, 514–523.
- Fanson, B. G., Yap, S. and Taylor, P. W.** (2012). Geometry of compensatory feeding and water consumption in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **215**, 766–773.
- Feder, M. E. and Hofmann, G. E.** (1999). Heat-shock Proteins, Molecular Chaperones, and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243–282.
- Fedina, T. Y., Kuo, T.-H., Dreisewerd, K., Dierick, H. A., Yew, J. Y. and Pletcher, S. D.** (2012). Dietary Effects on Cuticular Hydrocarbons and Sexual Attractiveness in *Drosophila*. *PLOS ONE* **7**, e49799.
- Felton, G. W.** (1996). Nutritive quality of plant protein: Sources of variation and insect herbivore responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**, 107–130.
- Ferguson, L. V., Heinrichs, D. E. and Sinclair, B. J.** (2016). Paradoxical acclimation responses in the thermal performance of insect immunity. *Oecologia* **181**, 77–85.
- Ferguson, L. V., Dhakal, P., Lebenzon, J. E., Heinrichs, D. E., Bucking, C. and Sinclair, B. J.** (2018). Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity. *Functional Ecology* **32**, 2357–2368.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J.** (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*.
- Fogleman, J. C., Starmer, W. T. and Heed, W. B.** (1981). Larval selectivity for yeast species by *Drosophila mojavensis* in natural substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4435–4439.
- Foley, B. R. and Telonis-Scott, M.** (2011). Quantitative genetic analysis suggests causal association between cuticular hydrocarbon composition and desiccation survival in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **106**, 68–77.
- François, A., Grebert, D., Rhimi, M., Mariadassou, M., Naudon, L., Rabot, S. and Meunier, N.** (2016). Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Sci Rep* **6**.
- Frazier, M. R., Woods, H. A. and Harrison, J. F.** (2001). Interactive Effects of Rearing Temperature and Oxygen on the Development of *Drosophila melanogaster*. *Physiological and Biochemical Zoology* **74**, 641–650.

- Freeland, W. J. and Janzen, D. H.** (1974). Strategies in Herbivory by Mammals: The Role of Plant Secondary Compounds. *The American Naturalist* **108**, 269–289.
- Fridmann-Sirkis, Y., Stern, S., Elgart, M., Galili, M., Zeisel, A., Shental, N. and Soen, Y.** (2014). Delayed development induced by toxicity to the host can be inherited by a bacterial-dependent, transgenerational effect. *Front. Genet.* **5**,.
- Friedman, T. B.** (1973). Observations on the regulation of uricase activity during development of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **8**, 37–45.
- Galenza, A., Hutchinson, J., Campbell, S. D., Hazes, B. and Foley, E.** (2016). Glucose modulates *Drosophila* longevity and immunity independent of the microbiota. *Biology Open* **5**, 165–173.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P. O.** (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257.
- Gaulke, C. A., Arnold, H. K., Humphreys, I. R., Kembel, S. W., O’Dwyer, J. P. and Sharpton, T. J.** (2018). Ecophylogenetics Clarifies the Evolutionary Association between Mammals and Their Gut Microbiota. *mBio* **9**, e01348-18.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J. L., Caris-Veyrat, C. and Génard, M.** (2008). How Does Tomato Quality (Sugar, Acid, and Nutritional Quality) Vary with Ripening Stage, Temperature, and Irradiance? *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1241–1250.
- Gems, D. and Doonan, R.** (2009). Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: Is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle* **8**, 1681–1687.
- Genta, F. A., Dillon, R. J., Terra, W. R. and Ferreira, C.** (2006). Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* **52**, 593–601.
- Gerken, A. R., Eller, O. C., Hahn, D. A. and Morgan, T. J.** (2015). Constraints, independence, and evolution of thermal plasticity: Probing genetic architecture of long- and short-term thermal acclimation. *PNAS* 201503456.
- Giannakou, M. E., Goss, M. and Partridge, L.** (2008). Role of dFOXO in lifespan extension by dietary restriction in *Drosophila melanogaster*: not required, but its activity modulates the response. *Aging Cell* **7**, 187–198.
- Gibbs, A. G., Chippindale, A. K. and Rose, M. R.** (1997). Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **200**, 1821–1832.
- Gibbs, A. G., Fukuzato, F. and Matzkin, L. M.** (2003). Evolution of water conservation mechanisms in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* **206**, 1183–1192.
- Gibert, P., Moreteau, B. and David, J. R.** (2000). Developmental constraints on an adaptive plasticity: reaction norms of pigmentation in adult segments of *Drosophila melanogaster*. *Evolution & Development* **2**, 249–260.
- Gibert, J. P., Dell, A. I., DeLong, J. P. and Pawar, S.** (2015). Chapter One - Scaling-up Trait Variation from Individuals to Ecosystems. In *Advances in Ecological Research*, pp. 1–17. Academic Press.

- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J. S., Mills, J. A. and Merilä, J.** (2008). Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Mol. Ecol.* **17**, 167–178.
- Gilbert, S. F., Sapp, J. and Tauber, A. I.** (2012). A symbiotic view of life: we have never been individuals. *Q Rev Biol* **87**, 325–341.
- Glazier, D. S.** (2005). Beyond the ‘3/4-power law’: variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. *Biological Reviews* **80**, 611–662.
- Grandison, R. C., Piper, M. D. W. and Partridge, L.** (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* **462**, 1061–1064.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F.** (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* **283**, 1476–1481.
- Greer, E. L., Dowlatshahi, D., Banko, M. R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S. P. and Brunet, A.** (2007). An AMPK-FOXO Pathway Mediates Longevity Induced by a Novel Method of Dietary Restriction in *C. elegans*. *Current Biology* **17**, 1646–1656.
- Groemping, U.** (2006). Relative Importance for Linear Regression in R: The Package relaimpo. *Journal of Statistical Software*.
- Groussin, M., Mazel, F., Sanders, J. G., Smillie, C. S., Lavergne, S., Thuiller, W. and Alm, E. J.** (2017). Unraveling the processes shaping mammalian gut microbiomes over evolutionary time. *Nature Communications* **8**, 14319.
- Guay, J.-F., Boudreault, S., Michaud, D. and Cloutier, C.** (2009). Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *Journal of Insect Physiology* **55**, 919–926.
- Ha, E.-M., Oh, C.-T., Bae, Y. S. and Lee, W.-J.** (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**, 847–850.
- Ha, E.-M., Lee, K.-A., Park, S. H., Kim, S.-H., Nam, H.-J., Lee, H.-Y., Kang, D. and Lee, W.-J.** (2009). Regulation of DUOX by the Galphaq-phospholipase C β -Ca $^{2+}$ pathway in *Drosophila* gut immunity. *Dev. Cell* **16**, 386–397.
- Hammer, T. J. and Bowers, M. D.** (2015). Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia* **179**, 1–14.
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P. and Fierer, N.** (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *PNAS* **114**, 9641–9646.
- Harman, D.** (1972). The Biologic Clock: The Mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* **20**, 145–147.
- Harrison, J. F., Woods, H. A. and Roberts, S. P.** (2012). *Ecological and Environmental Physiology of Insects*. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Hartl, F. U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571–580.
- Hartwell, L. H. and Weinert, T. A.** (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629–634.

- Hayward, S. a. L., Pavlides, S. C., Tammariello, S. P., Rinehart, J. P. and Denlinger, D. L.** (2005). Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence. *J. Insect Physiol.* **51**, 631–640.
- Heinrichsen, E. T. and Haddad, G. G.** (2012). Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*. *PLOS ONE* **7**, e42587.
- Henry, Y., Piscart, C., Charles, S. and Colinet, H.** (2017). Combined effect of temperature and ammonia on molecular response and survival of the freshwater crustacean *Gammarus pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **137**, 42–48.
- Henry, Y., Renault, D. and Colinet, H.** (2018). Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in *Drosophila* flies (doi: 10.1242/jeb.169342). *Journal of Experimental Biology* **221**, jeb178681.
- Hercus, M. J., Loeschcke, V. and Rattan, S. I. S.** (2003). Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* **4**, 149–156.
- Herron, J. C. and Freeman, S.** (2013). *Evolutionary Analysis*. 5 edition. San Francisco, CA: Pearson.
- Heys, C., Lizé, A., Colinet, H., Price, T. A. R., Prescott, M., Ingleby, F. and Lewis, Z.** (2018a). Evidence That the Microbiota Counteracts Male Outbreeding Strategy by Inhibiting Sexual Signaling in Females. *Front. Ecol. Evol.* **6**,.
- Heys, C., Lizé, A., Blow, F., White, L., Darby, A. and Lewis, Z. J.** (2018b). The effect of gut microbiota elimination in *Drosophila melanogaster*: A how-to guide for host–microbiota studies. *Ecol Evol* **8**, 4150–4161.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. and Werren, J. H.** (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 215–220.
- Hilliker, A. J., Duyf, B., Evans, D. and Phillips, J. P.** (1992). Urate-null rosy mutants of *Drosophila melanogaster* are hypersensitive to oxygen stress. *PNAS* **89**, 4343–4347.
- Hoang, D., Kopp, A. and Chandler, J. A.** (2015). Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts—Is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly–yeast relationship? *PeerJ* **3**, e1116.
- Hochachka, P. W. and Somero, G. N.** (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press USA.
- Hoffmann, A. A. and Harshman, L. G.** (1999). Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels. *Heredity* **83**, 637–643.
- Hoffmann, A. A. and Hercus, M. J.** (2000). Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* **50**, 217–226.
- Hoffmann, A. A. and Parsons, P. A.** (1997). *Extreme Environmental Change and Evolution*. Cambridge University Press.
- Hoffmann, A. A., Anderson, A. and Hallas, R.** (2002). Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecology Letters* **5**, 614–618.

- Hoffmann, A. A., Sørensen, J. G. and Loeschcke, V.** (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology* **28**, 175–216.
- Holmström, K. M. and Finkel, T.** (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 411–421.
- Holmstrup, M., Hedlund, K. and Boriss, H.** (2002). Drought acclimation and lipid composition in *Folsomia candida*: implications for cold shock, heat shock and acute desiccation stress. *Journal of Insect Physiology* **48**, 961–970.
- Hongoh, Y. and Ishikawa, H.** (1997). Uric Acid as a Nitrogen Resource for the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*: Studies with Synthetic Diets and Aposymbiotic Insects. *Zoological Science* **14**, 581–586.
- Hori, Y. and Kimura, M. T.** (1998). Relationship Between Cold Stupor and Cold Tolerance in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Environ Entomol* **27**, 1297–1302.
- Horváth, B. and Kalinka, A. T.** (2016). Effects of larval crowding on quantitative variation for development time and viability in *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol* **6**, 8460–8473.
- Hoseinifar, S. H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F.** (2015). The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish & Shellfish Immunology* **42**, 533–538.
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Shimada, M. and Fukatsu, T.** (2008). Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biol Lett* **4**, 45–48.
- Hothorn, T., Bretz, F. and Westfall, P.** (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biom. J.* **50**, 346–363.
- Huang, J.-H. and Douglas, A. E.** (2015). Consumption of dietary sugar by gut bacteria determines *Drosophila* lipid content. *Biology Letters* **11**, 20150469.
- Hulbert, A. J., Clancy, D. J., Mair, W., Braeckman, B. P., Gems, D. and Partridge, L.** (2004). Metabolic rate is not reduced by dietary-restriction or by lowered insulin/IGF-1 signalling and is not correlated with individual lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* **39**, 1137–1143.
- Hutchinson, G. E.** (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **22**, 415–427.
- Imasheva, A. G. and Bublik, O. A.** (2003). Quantitative variation of four morphological traits in *Drosophila melanogaster* under larval crowding. *Hereditas* **138**, 193–199.
- Ireland, S. and Turner, B.** (2006). The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Science International* **159**, 175–181.
- Ja, W. W., Carvalho, G. B., Mak, E. M., Rosa, N. N. de la, Fang, A. Y., Liang, J. C., Brummel, T. and Benzer, S.** (2007). Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *PNAS* **104**, 8253–8256.

- James, A. C., Azevedo, R. B. R. and Partridge, L.** (1997). Genetic and Environmental Responses to Temperature of *Drosophila melanogaster* From a Latitudinal Cline. *Genetics* **146**, 881–890.
- Jehrke, L., Stewart, F. A., Droste, A. and Beller, M.** (2018). The impact of genome variation and diet on the metabolic phenotype and microbiome composition of *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports* **8**, 6215.
- Jensen, K., Mayntz, D., Toft, S., Clissold, F. J., Hunt, J., Raubenheimer, D. and Simpson, S. J.** (2012). Optimal foraging for specific nutrients in predatory beetles. *Proc. Biol. Sci.* **279**, 2212–2218.
- Jensen, P., Overgaard, J., Loeschcke, V., Schou, M. F., Malte, H. and Kristensen, T. N.** (2014). Inbreeding effects on standard metabolic rate investigated at cold, benign and hot temperatures in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **62**, 11–20.
- Jiménez Padilla, Y.** (2016). Effects of gut-associated yeasts on *Drosophila melanogaster* performance. *Electronic Thesis and Dissertation Repository*.
- Johnston, C. S., Steplewska, I., Long, C. A., Harris, L. N. and Ryals, R. H.** (2010). Examination of the antiglycemic properties of vinegar in healthy adults. *Ann. Nutr. Metab.* **56**, 74–79.
- Jones, E. I., Afkhami, M. E., Akçay, E., Bronstein, J. L., Bshary, R., Frederickson, M. E., Heath, K. D., Hoeksema, J. D., Ness, J. H., Pankey, M. S., et al.** (2015). Cheaters must prosper: reconciling theoretical and empirical perspectives on cheating in mutualism. *Ecology Letters* **18**, 1270–1284.
- Joshi, A. and Mueller, L. D.** (1993). Directional and Stabilizing Density-Dependent Natural Selection for Pupation Height in *Drosophila Melanogaster*. *Evolution* **47**, 176–184.
- Joshi, A., Shiotsugu, J. and Mueller, L. D.** (1996). Phenotypic enhancement of longevity by environmental urea in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* **31**, 533–544.
- Joy, T. K., Arik, A. J., Corby-Harris, V., Johnson, A. A. and Riehle, M. A.** (2010). The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Gerontology* **45**, 685–690.
- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G. and Strohm, E.** (2005). Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Current Biology* **15**, 475–479.
- Kaltenpoth, M., Yildirim, E., Gürbüz, M. F., Herzner, G. and Strohm, E.** (2012). Refining the Roots of the Beewolf-*Streptomyces* Symbiosis: Antennal Symbionts in the Rare Genus *Philanthinus* (Hymenoptera, Crabronidae). *Appl Environ Microbiol* **78**, 822–827.
- Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V. and Benzer, S.** (2004). Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology* **14**, 885–890.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. and Gordon, J. I.** (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* **474**, 327–336.
- Kearney, M., Shine, R. and Porter, W. P.** (2009). The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *PNAS* **106**, 3835–3840.

- Keebaugh, E. S., Yamada, R., Obadia, B., Ludington, W. B. and Ja, W. W.** (2018). Microbial quantity impacts *Drosophila* nutrition, development, and lifespan. *iScience* **0**.
- Keller, A.** (2007). *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. *Current Biology* **17**, R77–R81.
- Kellermann, V., Overgaard, J., Hoffmann, A. A., Fløjgaard, C., Svenning, J.-C. and Loeschcke, V.** (2012). Upper thermal limits of *Drosophila* are linked to species distributions and strongly constrained phylogenetically. *PNAS* 201207553.
- Klepsatel, P., Procházka, E. and Gáliková, M.** (2018). Crowding of *Drosophila* larvae affects lifespan and other life-history traits via reduced availability of dietary yeast. *Experimental Gerontology* **110**, 298–308.
- Kock, R. A., Orynbayev, M., Robinson, S., Zuther, S., Singh, N. J., Beauvais, W., Morgan, E. R., Kerimbayev, A., Khomenko, S., Martineau, H. M., et al.** (2018). Saigas on the brink: Multidisciplinary analysis of the factors influencing mass mortality events. *Science Advances* **4**, eaao2314.
- Kolss, M., Vijendravarma, R. K., Schwaller, G. and Kawecki, T. J.** (2009). Life-History Consequences of Adaptation to Larval Nutritional Stress in *Drosophila*. *Evolution* **63**, 2389–2401.
- Korsloot, A., Gestel, C. A. M. van and Straalen, N. M. van** (2004). *Environmental Stress and Cellular Response in Arthropods*. 1 edition. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Kos, M., Broekgaarden, C., Kabouw, P., Lenferink, K. O., Poelman, E. H., Vet, L. E. M., Dicke, M. and Loon, J. J. A. van** (2011). Relative importance of plant-mediated bottom-up and top-down forces on herbivore abundance on *Brassica oleracea*. *Functional Ecology* **25**, 1113–1124.
- Košťál, V., Vambera, J. and Bastl, J.** (2004). On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *J. Exp. Biol.* **207**, 1509–1521.
- Košťál, V., Zahradníčková, H. and Šimek, P.** (2011a). Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *PNAS*.
- Košťál, V., Korbelová, J., Rozsypal, J., Zahradníčková, H., Cimlová, J., Tomčala, A. and Šimek, P.** (2011b). Long-Term Cold Acclimation Extends Survival Time at 0°C and Modifies the Metabolomic Profiles of the Larvae of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE* **6**, e25025.
- Košťál, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Cimlová, J. and Štětina, T.** (2012). Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *PNAS* **109**, 3270–3274.
- Košťál, V., Korbelová, J., Poupardin, R., Moos, M. and Šimek, P.** (2016). Arginine and proline applied as food additives stimulate high freeze tolerance in larvae of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **219**, 2358–2367.
- Koyama, T., Mendes, C. C. and Mirth, C. K.** (2013). Mechanisms regulating nutrition-dependent developmental plasticity through organ-specific effects in insects. *Front Physiol* **4**.

- Koyle, M. L., Veloz, M., Judd, A. M., Wong, A. C.-N., Newell, P. D., Douglas, A. E. and Chaston, J. M.** (2016). Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e54219–e54219.
- Krebs, R. A. and Loeschcke, V.** (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional ecology* **8**, 730–737.
- Krenek, S., Petzoldt, T. and Berendonk, T. U.** (2012). Coping with Temperature at the Warm Edge – Patterns of Thermal Adaptation in the Microbial Eukaryote *Paramecium caudatum*. *PLOS ONE* **7**, e30598.
- Kristensen, T. N., Hoffmann, A. A., Overgaard, J., Sørensen, J. G., Hallas, R. and Loeschcke, V.** (2008). Costs and benefits of cold acclimation in field-released *Drosophila*. *PNAS* **105**, 216–221.
- Kubrak, O. I., Nylin, S., Flatt, T., Nässel, D. R. and Leimar, O.** (2017). Adaptation to fluctuating environments in a selection experiment with *Drosophila melanogaster*. *Ecology and Evolution* **7**, 3796–3807.
- Kültz, D.** (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* **206**, 3119–3124.
- Kültz, D.** (2005). Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. *Annual Review of Physiology* **67**, 225–257.
- Kuranouchi, T., Nakamura, T., Shimamura, S., Kojima, H., Goka, K., Okabe, K. and Mochizuki, A.** (2006). Nitrogen fixation in the stag beetle, *Dorcus (Macrodercus) rectus* (Motschulsky) (Col., Lucanidae). *Journal of Applied Entomology* **130**, 471–472.
- Lalouette, L., Williams, C. M., Hervant, F., Sinclair, B. J. and Renault, D.** (2011). Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **158**, 229–234.
- Layalle, S., Arquier, N. and Léopold, P.** (2008). The TOR Pathway Couples Nutrition and Developmental Timing in *Drosophila*. *Developmental Cell* **15**, 568–577.
- Le Bourg, E. and Rattan, S. I. S. eds.** (2008). *Mild Stress and Healthy Aging: Applying hormesis in aging research and interventions*. Springer Netherlands.
- Le Bourg, E.** (2001). Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* **498**, 183–186.
- Le Bourg, E.** (2003). Delaying aging: could the study of hormesis be more helpful than that of the genetic pathway used to survive starvation? *Biogerontology* **4**, 319–324.
- Le Bourg, É.** (2007). Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* **8**, 431–444.
- Le Bourg, É.** (2010a). Combined effects of suppressing live yeast and of a cold pretreatment on longevity, aging and resistance to several stresses in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* **11**, 245–254.

- Le Bourg, É.** (2010b). Predicting whether dietary restriction would increase longevity in species not tested so far. *Ageing Research Reviews* **9**, 289–297.
- Le Bourg, É.** (2013). Fasting can protect young and middle-aged *Drosophila melanogaster* flies against a severe cold stress. *Biogerontology* **14**, 513–529.
- Le Bourg, É.** (2015). Fasting and other mild stresses with hormetic effects in *Drosophila melanogaster* can additively increase resistance to cold. *Biogerontology* **16**, 517–527.
- Le Bourg, É.** (2016). Life-time protection against severe heat stress by exposing young *Drosophila melanogaster* flies to a mild cold stress. *Biogerontology* **17**, 409–415.
- Le Bourg, É. and Minois, N.** (2005). Does dietary restriction really increase longevity in *Drosophila melanogaster*? *Ageing Research Reviews* **4**, 409–421.
- Le Bourg, É., Valenti, P., Lucchetta, P. and Payre, F.** (2001). Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* **2**, 155–164.
- Le Bourg, É., Valenti, P. and Payre, F.** (2002). Lack of hypergravity-associated longevity extension in *Drosophila melanogaster* flies overexpressing hsp70. *Biogerontology* **3**, 355–364.
- Le Bourg, E., Gauthier, T. and Colinet, H.** (2015). Feeding on frozen live yeast has some deleterious effects in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* **69**, 202–210.
- Le Rohellec, M. and Le Bourg, E.** (2009). Contrasted effects of suppressing live yeast from food on longevity, aging and resistance to several stresses in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **44**, 695–707.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and Keersmaecker, S. C. J. D.** (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 171–184.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D. and Ventura, M.** (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 160–168.
- Lee, R. ed.** (1991). *Insects at Low Temperature*. Springer US.
- Lee, K. P. and Jang, T.** (2014). Exploring the nutritional basis of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* **28**, 1144–1155.
- Lee, K. P., Raubenheimer, D. and Simpson, S. J.** (2004). The effects of nutritional imbalance on compensatory feeding for cellulose-mediated dietary dilution in a generalist caterpillar. *Physiological Entomology* **29**, 108–117.
- Lee, K. P., Simpson, S. J., Clissold, F. J., Brooks, R., Ballard, J. W. O., Taylor, P. W., Soran, N. and Raubenheimer, D.** (2008a). Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. *PNAS* **105**, 2498–2503.
- Lee, K. P., Simpson, S. J. and Wilson, K.** (2008b). Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecology* **22**, 1052–1061.
- Leftwich, P. T., Clarke, N. V. E., Hutchings, M. I. and Chapman, T.** (2017). Gut microbiomes and reproductive isolation in *Drosophila*. *PNAS* **114**, 12767–12772.

- Leftwich, P. T., Clarke, N. V. E., Hutchings, M. I. and Chapman, T.** (2018). Reply to Obadia et al.: Effect of methyl paraben on host–microbiota interactions in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **115**, E4549–E4550.
- Leitão-Gonçalves, R., Carvalho-Santos, Z., Francisco, A. P., Fioreze, G. T., Anjos, M., Baltazar, C., Elias, A. P., Itskov, P. M., Piper, M. D. W. and Ribeiro, C.** (2017). Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLOS Biology* **15**, e2000862.
- Levins, R.** (1969). Thermal Acclimation and Heat Resistance in *Drosophila* Species. *The American Naturalist* **103**, 483–499.
- Lewis, Z., Heys, C., Prescott, M. and Lizé, A.** (2014). You are what you eat. *Gut Microbes* **5**, 541–543.
- Lighton, J. R. B. and Halsey, L. G.** (2011). Flow-through respirometry applied to chamber systems: Pros and cons, hints and tips. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **158**, 265–275.
- Lihoreau, M., Clarke, I. M., Buhl, J., Sumpter, D. J. T. and Simpson, S. J.** (2016). Collective selection of food patches in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* **219**, 668–675.
- Lints, F. A. and Lints, C. V.** (1969). Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids I. Preimaginal population density. *Experimental Gerontology* **4**, 231–244.
- Liu, H., Dicksved, J., Lundh, T. and Lindberg, J. E.** (2014). Heat Shock Proteins: Intestinal Gatekeepers that Are Influenced by Dietary Components and the Gut Microbiota. *Pathogens* **3**, 187–210.
- Lizé, A., McKay, R. and Lewis, Z.** (2014). Kin recognition in *Drosophila*: the importance of ecology and gut microbiota. *The ISME Journal* **8**, 469–477.
- Loeschcke, V., Krebs, R. A. and Barker, J. S. F.** (1994). Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. *Biological Journal of the Linnean Society* **52**, 83–92.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. and Knight, R.** (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–230.
- Luckey, T. D.** (2006). Radiation Hormesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Dose Response* **4**, 169–190.
- Lushchak, O. V., Rovenko, B. M., Gospodaryov, D. V. and Lushchak, V. I.** (2011). *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **160**, 27–34.
- Ma, G. and Ma, C.-S.** (2012). Effect of acclimation on heat-escape temperatures of two aphid species: Implications for estimating behavioral response of insects to climate warming. *J. Insect Physiol.* **58**, 303–309.
- Ma, D., Storelli, G., Mitchell, M. and Leulier, F.** (2015). Studying host-microbiota mutualism in *Drosophila*: Harnessing the power of gnotobiotic flies. *Biomed J* **38**, 285–293.

- Macmillan, H. A. and Sinclair, B. J.** (2011). Mechanisms underlying insect chill-coma. *J. Insect Physiol.* **57**, 12–20.
- MacMillan, H. A., Ferguson, L. V., Nicolai, A., Donini, A., Staples, J. F. and Sinclair, B. J.** (2014). Parallel ionoregulatory adjustments underlie phenotypic plasticity and evolution of *Drosophila* cold tolerance. *Journal of Experimental Biology* jeb.115790.
- MacMillan, H. A., Yerushalmi, G. Y., Jonusaite, S., Kelly, S. P. and Donini, A.** (2017). Thermal acclimation mitigates cold-induced paracellular leak from the *Drosophila* gut. *Scientific Reports* **7**, 8807.
- Magoč, T. and Salzberg, S. L.** (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**, 2957–2963.
- Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S. D. and Partridge, L.** (2003). Demography of Dietary Restriction and Death in *Drosophila*. *Science* **301**, 1731–1733.
- Mair, W., Piper, M. D. W. and Partridge, L.** (2005). Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **3**, e223.
- Manichanh, C., Borrueal, N., Casellas, F. and Guarner, F.** (2012). The gut microbiota in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **9**, 599–608.
- Marron, M. T., Markow, T. A., Kain, K. J. and Gibbs, A. G.** (2003). Effects of starvation and desiccation on energy metabolism in desert and mesic *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology* **49**, 261–270.
- Marshall, K. E. and Sinclair, B. J.** (2009). Repeated stress exposure results in a survival–reproduction trade-off in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* rspb20091807.
- Martino, M. E., Joncour, P., Leenay, R., Gervais, H., Shah, M., Hughes, S., Gillet, B., Beisel, C. and Leulier, F.** (2018). Bacterial Adaptation to the Host’s Diet Is a Key Evolutionary Force Shaping *Drosophila*-*Lactobacillus* Symbiosis. *Cell Host & Microbe* **24**, 109-119.e6.
- Martinson, V. G., Moy, J. and Moran, N. A.** (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2830–2840.
- Martinson, V. G., Douglas, A. E. and Jaenike, J.** (2017). Community structure of the gut microbiota in sympatric species of wild *Drosophila*. *Ecology Letters* **20**, 629–639.
- Matos, R. C., Schwarzer, M., Gervais, H., Courtin, P., Joncour, P., Gillet, B., Ma, D., Bulteau, A.-L., Martino, M. E., Hughes, S., et al.** (2017). D-Alanylation of teichoic acids contributes to *Lactobacillus plantarum* -mediated *Drosophila* growth during chronic undernutrition. *Nature Microbiology* **2**, 1635–1647.
- Matzkin, L. M., Johnson, S., Paight, C., Bozinovic, G. and Markow, T. A.** (2011). Dietary Protein and Sugar Differentially Affect Development and Metabolic Pools in Ecologically Diverse *Drosophila*. *J Nutr* **141**, 1127–1133.
- May, C. M., Doroszuk, A. and Zwaan, B. J.** (2015). The effect of developmental nutrition on life span and fecundity depends on the adult reproductive environment in *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol* **5**, 1156–1168.

- Mayntz, D., Raubenheimer, D., Salomon, M., Toft, S. and Simpson, S. J.** (2005). Nutrient-specific foraging in invertebrate predators. *Science* **307**, 111–113.
- McCay, C. M., Crowell, M. F. and Maynard, L. A.** (1935). The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size One Figure. *J Nutr* **10**, 63–79.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., et al.** (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3229–3236.
- McMurdie, P. J. and Holmes, S.** (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **8**, e61217.
- McMurdie, P. J. and Holmes, S.** (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Computational Biology* **10**, e1003531.
- Merilä, J. and Hendry, A. P.** (2014). Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* **7**, 1–14.
- Merilä, J., Laurila, A. and Lindgren, B.** (2004). Variation in the degree and costs of adaptive phenotypic plasticity among *Rana temporaria* populations. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 1132–1140.
- Messamah, B., Kellermann, V., Malte, H., Loeschcke, V. and Overgaard, J.** (2017). Metabolic cold adaptation contributes little to the interspecific variation in metabolic rates of 65 species of Drosophilidae. *Journal of Insect Physiology* **98**, 309–316.
- Min, K.-J. and Tatar, M.** (2006). Drosophila diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients? *Mechanisms of Ageing and Development* **127**, 93–96.
- Min, K.-J., Flatt, T., Kulaots, I. and Tatar, M.** (2007). Counting calories in Drosophila diet restriction. *Experimental Gerontology* **42**, 247–251.
- Mirth, C. K. and Piper, M. D.** (2017). Matching complex dietary landscapes with the signalling pathways that regulate life history traits. *Current Opinion in Genetics & Development* **47**, 9–16.
- Mirth, C. K. and Riddiford, L. M.** (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays* **29**, 344–355.
- Mirth, C., Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (2005). The Role of the Prothoracic Gland in Determining Critical Weight for Metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* **15**, 1796–1807.
- Mitchell, K. A. and Hoffmann, A. A.** (2010). Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. *Functional Ecology* **24**, 694–700.
- Miyakawa, H., Woo, S. K., Dahl, S. C., Handler, J. S. and Kwon, H. M.** (1999). Tonicity-responsive enhancer binding protein, a Rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *PNAS* **96**, 2538–2542.

- Moghadam, N. N., Holmstrup, M., Manenti, T. and Loeschcke, V.** (2015). Phospholipid fatty acid composition linking larval-density to lifespan of adult *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* **72**, 177–183.
- Moghadam, N. N., Thorshauge, P. M., Kristensen, T. N., Jonge, N. de, Bahrndorff, S., Kjeldal, H. and Nielsen, J. L.** (2018). Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature. *Fly* **12**, 1–12.
- Montllor, C. B., Maxmen, A. and Purcell, A. H.** (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189–195.
- Morais, P. B., Martins, M. B., Klaczko, L. B., Mendonça-Hagler, L. C. and Hagler, A. N.** (1995). Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4251–4257.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. and Van Remmen, H.** (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 477–503.
- Mullins, D. E. and Cochran, D. G.** (1975). Nitrogen metabolism in the american cockroach—II. An examination of negative nitrogen balance with respect to mobilization of uric acid stores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **50**, 501–510.
- Murray, A.** (1994). Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology* **6**, 872–876.
- Musselman, L. P., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S. S., Cagan, R. L. and Baranski, T. J.** (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms* **4**, 842–849.
- Najarro, M. A., Sumethasorn, M., Lamoureux, A. and Turner, T. L.** (2015). Choosing mates based on the diet of your ancestors: replication of non-genetic assortative mating in *Drosophila melanogaster*. *PeerJ* **3**, e1173.
- Nakagawa, S., Lagisz, M., Hector, K. L. and Spencer, H. G.** (2012). Comparative and meta-analytic insights into life extension via dietary restriction. *Aging Cell* **11**, 401–409.
- Nasir, H. and Noda, H.** (2003). Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **52**, 175–182.
- Newell, P. D. and Douglas, A. E.** (2014). Interspecies Interactions Determine the Impact of the Gut Microbiota on Nutrient Allocation in *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 788–796.
- Nijhout, H. F.** (2003). Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution & Development* **5**, 9–18.
- Nogge, G.** (1976). Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia* **32**, 995–996.
- Nunney, L.** (1990). *Drosophila* on Oranges: Colonization, Competition, and Coexistence. *Ecology* **71**, 1904–1915.

- Obadia, B., Güvener, Z. T., Zhang, V., Ceja-Navarro, J. A., Brodie, E. L., Ja, W. W. and Ludington, W. B.** (2017). Probabilistic Invasion Underlies Natural Gut Microbiome Stability. *Curr. Biol.* **27**, 1999–2006.e8.
- Obadia, B., Keebaugh, E. S., Yamada, R., Ludington, W. B. and Ja, W. W.** (2018). Diet influences host–microbiota associations in *Drosophila*. *PNAS* **115**, E4547–E4548.
- O’Donnell, M. J. and Donini, A.** (2017). Nitrogen Excretion and Metabolism in Insects. In *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*, pp. 109–126. Springer, Cham.
- Ohtsu, T., Kimura, M. T. and Hori, S. H.** (1992). Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. *J Comp Physiol B* **162**, 203–208.
- Oliver, K. M., Moran, N. A. and Hunter, M. S.** (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *PNAS* **102**, 12795–12800.
- Olsson, T., MacMillan, H. A., Nyberg, N., Stärk, D., Malmendal, A. and Overgaard, J.** (2016). Hemolymph metabolites and osmolality are tightly linked to cold tolerance of *Drosophila* species: a comparative study. *Journal of Experimental Biology* jeb.140152.
- Overend, G., Luo, Y., Henderson, L., Douglas, A. E., Davies, S. A. and Dow, J. A. T.** (2016). Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. *Sci Rep* **6**,.
- Overgaard, J. and MacMillan, H. A.** (2017). The Integrative Physiology of Insect Chill Tolerance. *Annual Review of Physiology* **79**, 187–208.
- Overgaard, J., Malmendal, A., Sørensen, J. G., Bundy, J. G., Loeschke, V., Nielsen, N. C. and Holmstrup, M.** (2007). Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **53**, 1218–1232.
- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Krogh, P. H., Šimek, P. and Košťál, V.** (2008). Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **54**, 619–629.
- Pais, I. S., Valente, R. S., Sporniak, M. and Teixeira, L.** (2018). *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. *PLOS Biology* **16**, e2005710.
- Park, J.-H., Attardo, G. M., Hansen, I. A. and Raikhel, A. S.** (2006). GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* **281**, 11167–11176.
- Parker, E. D., Forbes, V. E., Nielsen, S. L., Ritter, C., Barata, C., Baird, D. J., Admiraal, W., Levin, L., Loeschke, V., Lytikäinen-Saarenmaa, P., et al.** (1999). Stress in Ecological Systems. *Oikos* **86**, 179–184.
- Partridge, L., Barrie, B., Fowler, K. and French, V.** (1994). Evolution and Development of Body Size and Cell Size in *Drosophila Melanogaster* in Response to Temperature. *Evolution* **48**, 1269–1276.

- Partridge, L., Barrie, B., Barton, N. H., Fowler, K. and French, V.** (1995). Rapid Laboratory Evolution of Adult Life-History Traits in *Drosophila Melanogaster* in Response to Temperature. *Evolution* **49**, 538–544.
- Partridge, L., Piper, M. D. W. and Mair, W.** (2005). Dietary restriction in *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**, 938–950.
- Pearce, A. K. and Humphrey, T. C.** (2001). Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends in Cell Biology* **11**, 426–433.
- Pérez, V. I., Bokov, A., Remmen, H. V., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y. and Richardson, A.** (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1790**, 1005–1014.
- Péronnet, F. and Massicotte, D.** (1991). Table of nonprotein respiratory quotient: an update. *Can J Sport Sci* **16**, 23–29.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J. and Vulpe, C. D.** (2008). Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8**, 1744–1749.
- Phillips, J. E., Hanrahan, J., Chamberlin, M. and Thomson, B.** (1987). Mechanisms and Control of Reabsorption in Insect Hindgut. In *Advances in Insect Physiology* (ed. Evans, P. D.) and Wigglesworth, V. B.), pp. 329–422. Academic Press.
- Pierce, G. J. and Ollason, J. G.** (1987). Eight Reasons Why Optimal Foraging Theory Is a Complete Waste of Time. *Oikos* **49**, 111–118.
- Piersma, T. and Drent, J.** (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 228–233.
- Pigliucci, M.** (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 481–486.
- Piper, M. D. W., Partridge, L., Raubenheimer, D. and Simpson, S. J.** (2011). Dietary Restriction and Aging: A Unifying Perspective. *Cell Metabolism* **14**, 154–160.
- Piper, M. D. W., Blanc, E., Leitão-Gonçalves, R., Yang, M., He, X., Linford, N. J., Hoddinott, M. P., Hopfen, C., Soultoukis, G. A., Niemeyer, C., et al.** (2014). A holidic medium for *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods* **11**, 100–105.
- Pletcher, S. D., Macdonald, S. J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S. C., Goldstein, D. B. and Partridge, L.** (2002). Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **12**, 712–723.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafka, E., Typas, A., Sauer, U., et al.** (2017). Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Syst* **5**, 345–357.e6.
- Pörtner, H. O., Dijk, P. L. M. van, Hardewig, I. and Sommer, A.** (2000). Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms.
- Potrikus, C. J. and Breznak, J. A.** (1981). Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: A strategy for nutrient conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4601–4605.

- Privalov, P. L.** (1990). Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 281–305.
- Pyke, G. H., Pulliam, H. R. and Charnov, E. L.** (1977). Optimal Foraging: A Selective Review of Theory and Tests. *The Quarterly Review of Biology* **52**, 137–154.
- R Core Team** (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Raubenheimer, D. and Jones, S. A.** (2006). Nutritional imbalance in an extreme generalist omnivore: tolerance and recovery through complementary food selection. *Animal Behaviour* **71**, 1253–1262.
- Raubenheimer, D., Simpson, S. J. and Mayntz, D.** (2009). Nutrition, ecology and nutritional ecology: toward an integrated framework. *Functional Ecology* **23**, 4–16.
- Reiser, V., Raitt, D. C. and Saito, H.** (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology* **161**, 1035–1040.
- Relyea, R. A.** (2002). Costs of Phenotypic Plasticity. *The American Naturalist* **159**, 272–282.
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S. E. and Tower, J.** (2007). Increased Internal and External Bacterial Load during *Drosophila* Aging without Life-Span Trade-Off. *Cell Metabolism* **6**, 144–152.
- Ridley, E. V., Wong, A. C.-N., Westmiller, S. and Douglas, A. E.** (2012). Impact of the Resident Microbiota on the Nutritional Phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE* **7**, e36765.
- Ridley, E. V., Wong, A. C. N. and Douglas, A. E.** (2013). Microbe-dependent and nonspecific effects of procedures to eliminate the resident microbiota from *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3209–3214.
- Rion, S. and Kawecki, T. J.** (2007). Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 1655–1664.
- Robak, M. J. and Richards-Zawacki, C. L.** (2018). Temperature-Dependent Effects of Cutaneous Bacteria on a Frog's Tolerance of Fungal Infection. *Front. Microbiol.* **9**,.
- Rodrigues, A., Mueller, U. G., Ishak, H. D., Bacci, M. and Pagnocca, F. C.** (2011). Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. *FEMS Microbiol Ecol* **78**, 244–255.
- Rodrigues, M. A., Martins, N. E., Balancé, L. F., Broom, L. N., Dias, A. J. S., Fernandes, A. S. D., Rodrigues, F., Sucena, É. and Mirth, C. K.** (2015). *Drosophila melanogaster* larvae make nutritional choices that minimize developmental time. *J. Insect Physiol.* **81**, 69–80.
- Rosenberg, E. and Zilber-Rosenberg, I.** (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* **6**, 78.
- Rosenberg, E., Sharon, G. and Zilber-Rosenberg, I.** (2009). The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental Microbiology* **11**, 2959–2962.
- Rouault, J.-D., Marican, C., Wicker-Thomas, C. and Jallon, J.-M.** (2004). Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding

- temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Genetica* **120**, 195–212.
- Rouault, G., Candau, J.-N., Lieutier, F., Nageleisen, L.-M., Martin, J.-C. and Warzée, N.** (2006). Effects of drought and heat on forest insect populations in relation to the 2003 drought in Western Europe. *Ann. For. Sci.* **63**, 613–624.
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C. and Piškur, J.** (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature Communications* **2**, 302.
- Russell, J. A. and Moran, N. A.** (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **273**, 603–610.
- Ryu, J.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-Y., Bai, J. Y., Nam, Y.-D., Bae, J.-W., Lee, D. G., Shin, S. C., Ha, E.-M. and Lee, W.-J.** (2008). Innate Immune Homeostasis by the Homeobox Gene Caudal and Commensal-Gut Mutualism in *Drosophila*. *Science* **319**, 777–782.
- Ryu, T., Veilleux, H. D., Donelson, J. M., Munday, P. L. and Ravasi, T.** (2018). The epigenetic landscape of transgenerational acclimation to ocean warming. *Nature Climate Change* **8**, 504–509.
- Salmon, A. B., Richardson, A. and Pérez, V. I.** (2010). Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 642–655.
- Sanders, J. G., Lukasik, P., Frederickson, M. E., Russell, J. A., Koga, R., Knight, R. and Pierce, N. E.** (2017). Dramatic Differences in Gut Bacterial Densities Correlate with Diet and Habitat in Rainforest Ants. *Integr. Comp. Biol.* **57**, 705–722.
- Sannino, D. R., Dobson, A. J., Edwards, K., Angert, E. R. and Buchon, N.** (2018). The *Drosophila melanogaster* Gut Microbiota Provisions Thiamine to Its Host. *mBio* **9**, e00155-18.
- Sarangi, M., Nagarajan, A., Dey, S., Bose, J. and Joshi, A.** (2016). Evolution of increased larval competitive ability in *Drosophila melanogaster* without increased larval feeding rate. *J Genet* **95**, 491–503.
- Sautin, Y. Y. and Johnson, R. J.** (2008). Uric Acid: The Oxidant–Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **27**, 608–619.
- Scheiring, J. F., Davis, D. G., Banasinghe, A. and Teare, C. A.** (1984). Effects of larval crowding on life history parameters in *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera:Drosophilidae). *Entomological news*.
- Schmidt, P. S. and Paaby, A. B.** (2008). Reproductive Diapause and Life-History Clines in North American Populations of *Drosophila Melanogaster*. *Evolution* **62**, 1204–1215.
- Schmitz, O. J.** (2008). Herbivory from Individuals to Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**, 133–152.
- Schwarz, S., Durisko, Z. and Dukas, R.** (2014). Food selection in larval fruit flies: dynamics and effects on larval development. *Naturwissenschaften* **101**, 61–68.

- Scriber, J. M. and Slansky, F.** (1981). The Nutritional Ecology of Immature Insects. *Annual Review of Entomology* **26**, 183–211.
- Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E.** (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **107**, 20051–20056.
- Shenoi, V. N., Ali, S. Z. and Prasad, N. G.** (2016). Evolution of increased adult longevity in *Drosophila melanogaster* populations selected for adaptation to larval crowding. *J. Evol. Biol.* **29**, 407–417.
- Shin, S. C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H. and Lee, W.-J.** (2011). *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* **334**, 670–674.
- Shiotsugu, J., Leroi, A. M., Yashiro, H., Rose, M. R. and Mueller, L. D.** (1997). The Symmetry of Correlated Selection Responses in Adaptive Evolution: An Experimental Study Using *Drosophila*. *Evolution* **51**, 163–172.
- Simmons, F. H. and Bradley, T. J.** (1997). An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **43**, 779–788.
- Simpson, S. J. and Raubenheimer, D.** (1995). The geometric analysis of feeding and nutrition: a user's guide. *Journal of Insect Physiology* **41**, 545–553.
- Simpson, S. J. and Raubenheimer, D.** (2005). Obesity: the protein leverage hypothesis. *Obes Rev* **6**, 133–142.
- Simpson, S. J. and Raubenheimer, D.** (2012). *The Nature of Nutrition: A Unifying Framework from Animal Adaptation to Human Obesity*. Princeton University Press.
- Simpson, S. J. and Simpson, C. L.** (1990). The Mechanisms of Nutritional Compensation by Phytophagous Insects. In *Insect-Plant Interactions*, .
- Simpson, S. J., Sword, G. A., Lorch, P. D. and Couzin, I. D.** (2006). Cannibal crickets on a forced march for protein and salt. *PNAS* **103**, 4152–4156.
- Simpson, S. J., Sword, G. A. and Lo, N.** (2011). Polyphenism in Insects. *Current Biology* **21**, R738–R749.
- Simpson, S. J., Le Couteur, D. G., Raubenheimer, D., Solon-Biet, S. M., Cooney, G. J., Cogger, V. C. and Fontana, L.** (2017). Dietary protein, aging and nutritional geometry. *Ageing Research Reviews* **39**, 78–86.
- Sinclair, B. J. and Roberts, S. P.** (2005). Acclimation, shock and hardening in the cold. *Journal of Thermal Biology* **30**, 557–562.
- Sinclair, B. J., Vernon, P., Jaco Klok, C. and Chown, S. L.** (2003). Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 257–262.
- Sinclair, B. J., Gibbs, A. G. and Roberts, S. P.** (2007). Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* **16**, 435–443.

- Sinclair, B. J., Ferguson, L. V., Salehipour-shirazi, G. and MacMillan, H. A.** (2013). Cross-tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. *Integr. Comp. Biol.* **53**, 545–556.
- Sisodia, S. and Singh, B. N.** (2010). Resistance to environmental stress in *Drosophila ananassae*: latitudinal variation and adaptation among populations. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 1979–1988.
- Sisodia, S. and Singh, B. N.** (2012). Experimental Evidence for Nutrition Regulated Stress Resistance in *Drosophila ananassae*. *PLOS ONE* **7**, e46131.
- Skorupa, D. A., Dervisefendic, A., Zwiener, J. and Pletcher, S. D.** (2008). Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **7**, 478–490.
- Slansky, F. and Rodriguez, J. G.** (1987). *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates*. Wiley.
- Smith, K., McCoy, K. D. and Macpherson, A. J.** (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* **19**, 59–69.
- Soen, Y.** (2014). Environmental disruption of host–microbe co-adaptation as a potential driving force in evolution. *Front. Genet.* **5**,.
- Sohal, R. S. and Weindruch, R.** (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59–63.
- Sokolowski, M. B., Pereira, H. S. and Hughes, K.** (1997). Evolution of foraging behavior in *Drosophila* by density-dependent selection. *PNAS* **94**, 7373–7377.
- Somero, G. N.** (2011). Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **301**, R1–R14.
- Somero, G. N.** (2012). The Physiology of Global Change: Linking Patterns to Mechanisms. *Annual Review of Marine Science* **4**, 39–61.
- Somero, G. N. and Yancey, P. H.** (2010). Osmolytes and Cell-Volume Regulation: Physiological and Evolutionary Principles. In *Comprehensive Physiology*, p. John Wiley & Sons, Inc.
- Sørensen, J. G. and Loeschke, V.** (2001). Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *Journal of Insect Physiology* **47**, 1301–1307.
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N. and Overgaard, J.** (2016). Evolutionary and ecological patterns of thermal acclimation capacity in *Drosophila*: is it important for keeping up with climate change? *Current Opinion in Insect Science* **17**, 98–104.
- Sørensen, J. G., Schou, M. F. and Loeschke, V.** (2017). Evolutionary adaptation to environmental stressors: a common response at the proteomic level. *Evolution* **71**, 1627–1642.

- Stamps, J. A., Yang, L. H., Morales, V. M. and Boundy-Mills, K. L.** (2012). *Drosophila* Regulate Yeast Density and Increase Yeast Community Similarity in a Natural Substrate. *PLOS ONE* **7**, e42238.
- Starmer, W. T. and Phaff, H. J.** (1983). Analysis of the community structure of yeasts associated with the decaying stems of cactus. II. *Opuntia* species. *Microb Ecol* **9**, 247–259.
- Staubach, F., Baines, J. F., Künzel, S., Bik, E. M. and Petrov, D. A.** (2013). Host Species and Environmental Effects on Bacterial Communities Associated with *Drosophila* in the Laboratory and in the Natural Environment. *PLOS ONE* **8**, e70749.
- Stebbing, A. R. D.** (1982). Hormesis — The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment* **22**, 213–234.
- Steck, K., Walker, S. J., Itskov, P. M., Baltazar, C., Moreira, J.-M. and Ribeiro, C.** (2018). Internal amino acid state modulates yeast taste neurons to support protein homeostasis in *Drosophila*. *eLife* **7**,.
- Stefanini, I.** (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast* **35**, 315–330.
- Steinberg, C. E. W.** (2012). *Stress Ecology: Environmental Stress as Ecological Driving Force and Key Player in Evolution*. Springer Netherlands.
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J. and Leulier, F.** (2011). *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab.* **14**, 403–414.
- Storelli, G., Strigini, M., Grenier, T., Bozonnet, L., Schwarzer, M., Daniel, C., Matos, R. and Leulier, F.** (2018). *Drosophila* Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont *Lactobacillus plantarum*. *Cell Metab.* **27**, 362-377.e8.
- Strohm, E. and Linsenmair, K. E.** (1999). Measurement of parental investment and sex allocation in the European beewolf *Philanthus triangulum* F. (Hymenoptera: Sphecidae). *Behav Ecol Sociobiol* **47**, 76–88.
- Strömnæs, Ö. and Kvelland, I.** (1962). Sexual Activity of *Drosophila Melanogaster* Males. *Hereditas* **48**, 442–470.
- Sulmon, C., van Baaren, J., Cabello-Hurtado, F., Gouesbet, G., Hennion, F., Mony, C., Renault, D., Bormans, M., El Amrani, A., Wiegand, C., et al.** (2015). Abiotic stressors and stress responses: What commonalities appear between species across biological organization levels? *Environmental Pollution* **202**, 66–77.
- Tada, A., Kikuchi, Y., Hosokawa, T., Musolin, D. L., Fujisaki, K. and Fukatsu, T.** (2011). Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool* **46**, 483.
- Tammariello, S. P., Rinehart, J. P. and Denlinger, D. L.** (1999). Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but does not enhance tolerance to high or low temperatures. *Journal of Insect Physiology* **45**, 933–938.
- Tang, C., Sun, F., Zhang, X., Zhao, T. and Qi, J.** (2004). Transgenic ice nucleation-active *Enterobacter cloacae* reduces cold hardiness of corn borer and cotton bollworm larvae. *FEMS Microbiol Ecol* **51**, 79–86.

- Tang, H. Y., Smith-Caldas, M. S. B., Driscoll, M. V., Salhadar, S. and Shingleton, A. W.** (2011). FOXO Regulates Organ-Specific Phenotypic Plasticity In *Drosophila*. *PLOS Genetics* **7**, e1002373.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L. E., Nalin, R., et al.** (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology* **11**, 2574–2584.
- Tatar, M., Bartke, A. and Antebi, A.** (2003). The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals. *Science* **299**, 1346–1351.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A. and Masaki, S.** (1985). *Seasonal Adaptations of Insects*. New York: Oxford Univ Pr on Demand.
- Teets, N. M. and Denlinger, D. L.** (2013). Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiological Entomology* **38**, 105–116.
- Téfit, M. A., Gillet, B., Joncour, P., Hughes, S. and Leulier, F.** (2018). Stable association of a *Drosophila*-derived microbiota with its animal partner and the nutritional environment throughout a fly population's life cycle. *Journal of Insect Physiology* **106**, 2–12.
- Teixeira, L., Ferreira, Á. and Ashburner, M.** (2008). The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biology* **6**, e1000002.
- Teleman, A. A.** (2009). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem. J.* **425**, 13–26.
- Tennessen, J. M., Barry, W. E., Cox, J. and Thummel, C. S.** (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods* **68**, 105–115.
- Terra, W. R.** (1990). Evolution of Digestive Systems of Insects. *Annual Review of Entomology* **35**, 181–200.
- Tewksbury, J. J., Huey, R. B. and Deutsch, C. A.** (2008). Putting the Heat on Tropical Animals. *Science* **320**, 1296–1297.
- Tews, J., Brose, U., Grimm, V., Tielbörger, K., Wichmann, M. C., Schwager, M. and Jeltsch, F.** (2004). Animal species diversity driven by habitat heterogeneity/diversity: the importance of keystone structures. *Journal of Biogeography* **31**, 79–92.
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., Cryan, J. F., Gilbert, S. F., Goodnight, C. J., Lloyd, E. A., et al.** (2016). Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* **1**, e00028-16.
- Tissiéres, A., Mitchell, H. K. and Tracy, U. M.** (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* **84**, 389–398.
- Troyer, K.** (1984). Behavioral acquisition of the hindgut fermentation system by hatchling Iguana iguana. *Behav Ecol Sociobiol* **14**, 189–193.

- Tsai, C.-J., Maizel, J. V. and Nussinov, R.** (2002). The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two-state water structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 55–69.
- Tu, M.-P. and Tatar, M.** (2003). Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **2**, 327–333.
- Tyler, M. S.** (2000). *Developmental Biology: A Guide for Experimental Study*. Subsequent edition. Sunderland, Mass: Sinauer Associates Inc.
- Valanne, S., Wang, J.-H. and Rämet, M.** (2011). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* **186**, 649–656.
- van Baarlen, P., Kleerebezem, M. and Wells, J. M.** (2013). Omics approaches to study host–microbiota interactions. *Current Opinion in Microbiology* **16**, 270–277.
- Van Straalen, N. M.** (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 324A–330A.
- Vannier, G.** (1994). The thermobiological limits of some freezing intolerant insects: the supercooling and thermostupor points. *Acta oecologica* **15**, 31–42.
- Venu, I., Durisko, Z., Xu, J. and Dukas, R.** (2014). Social attraction mediated by fruit flies' microbiome. *Journal of Experimental Biology* **217**, 1346–1352.
- Vigne, P., Tauc, M. and Frelin, C.** (2009). Strong Dietary Restrictions Protect *Drosophila* against Anoxia/Reoxygenation Injuries. *PLOS ONE* **4**, e5422.
- Vijendravarma, R. K.** (2018). Experimental evolution demonstrates evolvability of preferential nutrient allocation to competing traits in response to chronic malnutrition. *J. Evol. Biol.*
- Vijendravarma, R. K., Narasimha, S. and Kawecki, T. J.** (2012). Evolution of foraging behaviour in response to chronic malnutrition in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **279**, 3540–3546.
- Vijendravarma, R. K., Narasimha, S. and Kawecki, T. J.** (2013). Predatory cannibalism in *Drosophila melanogaster* larvae. *Nature Communications* **4**, 1789.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F. and Lemaitre, B.** (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *PNAS* **102**, 11414–11419.
- Waldbauer, G. P., Cohen, R. W. and Friedman, S.** (1984). Self-Selection of an Optimal Nutrient Mix from Defined Diets by Larvae of the Corn Earworm, *Heliothis zea* (Boddie). *Physiological Zoology* **57**, 590–597.
- Wallner, W. E.** (1987). Factors Affecting Insect Population Dynamics: Differences Between Outbreak and Non-Outbreak Species. *Annual Review of Entomology* **32**, 317–340.
- Wallrath, L. L., Burnett, J. B. and Friedman, T. B.** (1990). Molecular characterization of the *Drosophila melanogaster* urate oxidase gene, an ecdysone-repressible gene expressed only in the malpighian tubules. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5114–5127.
- Wang, H.-D., Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S.** (2004). Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12610–12615.

- Wang, P., Bouwman, F. G. and Mariman, E. C. M.** (2009). Generally detected proteins in comparative proteomics – A matter of cellular stress response? *PROTEOMICS* **9**, 2955–2966.
- Warbrick-Smith, J., Behmer, S. T., Lee, K. P., Raubenheimer, D. and Simpson, S. J.** (2006). Evolving resistance to obesity in an insect. *PNAS* **103**, 14045–14049.
- Weihrauch, D., Donini, A. and O'Donnell, M. J.** (2012). Ammonia transport by terrestrial and aquatic insects. *Journal of Insect Physiology* **58**, 473–487.
- Werren, J. H., Baldo, L. and Clark, M. E.** (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 741–751.
- Wertheim, B., Marchais, J., Vet, L. E. M. and Dicke, M.** Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms. *Ecological Entomology* **27**, 608–617.
- West-Eberhard, M. J.** (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*. 1 edition. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- West-Eberhard, M. J.** (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *PNAS* **102**, 6543–6549.
- Whitman, D. ed.** (2009). *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences*. 1 edition. Enfield, NH: CRC Press.
- Wiebler, J. M., Kohl, K. D., Lee, R. E. and Costanzo, J. P.** (2018). Urea hydrolysis by gut bacteria in a hibernating frog: evidence for urea-nitrogen recycling in Amphibia. *Proc. R. Soc. B* **285**, 20180241.
- Willmer, P., Stone, G. and Johnston, I.** (2004). *Environmental Physiology of Animals*. 2 edition. Malden, Mass: Wiley-Blackwell.
- Winans, N. J., Walter, A., Chouaia, B., Chaston, J. M., Douglas, A. E. and Newell, P. D.** (2017). A genomic investigation of ecological differentiation between free-living and *Drosophila*-associated bacteria. *Molecular Ecology* **26**, 4536–4550.
- Wong, C. N. A., Ng, P. and Douglas, A. E.** (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environ Microbiol* **13**, 1889–1900.
- Wong, A. C.-N., Chaston, J. M. and Douglas, A. E.** (2013). The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *The ISME Journal* **7**, 1922.
- Wong, A. C.-N., Dobson, A. J. and Douglas, A. E.** (2014). Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *Journal of Experimental Biology* **217**, 1894–1901.
- Wong, A. C.-N., Holmes, A., Ponton, F., Lihoreau, M., Wilson, K., Raubenheimer, D. and Simpson, S. J.** (2015a). Behavioral Microbiomics: A Multi-Dimensional Approach to Microbial Influence on Behavior. *Front. Microbiol.* **6**.
- Wong, A. C.-N., Luo, Y., Jing, X., Franzenburg, S., Bost, A. and Douglas, A. E.** (2015b). The Host as the Driver of the Microbiota in the Gut and External Environment of *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 6232–6240.

- Wong, A. C.-N., Wang, Q.-P., Morimoto, J., Senior, A. M., Lihoreau, M., Neely, G. G., Simpson, S. J. and Ponton, F.** (2017). Gut Microbiota Modifies Olfactory-Guided Microbial Preferences and Foraging Decisions in *Drosophila*. *Current Biology* **27**, 2397-2404.e4.
- Yamada, R., Deshpande, S. A., Bruce, K. D., Mak, E. M. and Ja, W. W.** (2015). Microbes Promote Amino Acid Harvest to Rescue Undernutrition in *Drosophila*. *Cell Reports* **10**, 865–872.
- Yancey, P. H.** (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**, 2819–2830.
- Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L. and Zhao, L.** (2012). Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *The ISME Journal* **6**, 1848–1857.
- Zhu, J.-K.** (2002). Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247–273.
- Zhu, C.-T., Ingelmo, P. and Rand, D. M.** (2014). G×G×E for Lifespan in *Drosophila*: Mitochondrial, Nuclear, and Dietary Interactions that Modify Longevity. *PLOS Genetics* **10**, e1004354.
- Ziegler, M., Seneca, F. O., Yum, L. K., Palumbi, S. R. and Voolstra, C. R.** (2017). Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. *Nature Communications* **8**, 14213.
- Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E.** (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 723–735.
- Zwaan, B. J., Bijlsma, R. and Hoekstra, R. F.** (1991a). On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity* **66**, 29–39.
- Zwaan, B., Bijlsma, R. and Hoekstra, R.** (1991b). Heredity - Abstract of article: On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity* **66**, 29–39.

Remerciements

Les remerciements constituent une section à part du manuscrit d'une thèse. C'est à la fois la partie écrite le plus légèrement, mais probablement aussi la partie qui sera la plus lue et retenue¹. Ecrire cette section est donc une excellente façon de clôturer trois années de ma vie en remerciant celles et ceux qui ont comptés pour moi et pour l'avancée de la thèse. Je n'ai pas pour habitude de m'épancher en compliments, mais il me semble que la situation l'impose, tant les personnes que j'ai côtoyées durant ce travail ont été formidables. Toutes. Vraiment. Le doctorat est -je pense- tout autant un challenge scientifique qu'une mise à l'épreuve de la robustesse psychologique du candidat. C'est une période où l'on apprend à naviguer sur un océan et déceptions et apprécier chaque îlot de bonne nouvelle afin de conserver le cap. Cette métaphore « bateau » semble peut-être en dresser une image négative, pourtant, je souhaiterais à tout le monde de vivre cette expérience, et la referais les yeux fermés tant elle m'a apporté. L'entourage -professionnel ou non- a revêtu une importance déterminante durant cette période et c'est donc la boule au ventre (pour l'émotion, mais aussi pour la pression de n'oublier personne, et parce que je suis en retard sur mon rendu de manuscrit) que je rédige cette partie. Voici donc venu le temps de faire le bilan, calmement, en se remémorant chaque instant.

Le jury

Je remercie sincèrement Zenobia Lewis (thank you!), Patricia Gibert, Joan van Baaren, Philippe Vernon et tout particulièrement les rapporteurs Geneviève Prévost et Éric Le Bourg pour avoir accepté de constituer mon jury de thèse et d'examiner mon travail. C'est un honneur d'avoir un jury aussi large, et composé de personnes aux champs de compétences aussi hétéroclites. Merci.

Les mentors

David a réussi à me décoller des escargots dès ma première année de master, pour me convertir aux insectes. La suite a décidé qu'il devienne mon directeur de thèse (désolé). Même si son implication dans le sujet n'a pas pu être aussi importante que celle du deuxième compère, David a toujours pris le temps de faire des remarques justes sur mon travail, me diriger dans le bon sens lors des moments de doutes, et faire des vannes de qualité douteuses. Merci pour cela et pour tout le reste !

Hervé a été réellement au centre de cette thèse, et m'a (très) patiemment guidé pendant trois ans. Merci de m'avoir partagé l'enthousiasme pour les nouvelles données, merci de m'avoir poussé à aller de l'avant quand je corrigeais le `draft_ms_V3_corrige_finalfinal.txt` pour la 10ième fois dans mon coin, merci pour tous ces coups de main en manip, et merci pour la bonne humeur générale.

¹ D'ailleurs, il serait nécessaire d'envisager à l'avenir un reformatage structurel des manuscrits de thèse afin qu'ils comportent quatre chapitres de remerciements et une partie scientifique. Peut-être alors que les résultats seraient lus...

J'espère avoir été un doctorant à la hauteur de ton implication impressionnante et de ta pertinence scientifique.

Le laboratoire

Je remercie évidemment l'ensemble des personnes qui ont pu participer à mes comités de thèse. Merci donc à Anne Lizé, Julie Jaquiéry, Philippe Vernon (encore !), David Siaussat et Denis Poinot. Ces comités ont à chaque fois été l'occasion de discussions scientifiques et non-scientifiques extrêmement enrichissantes. Je profite de cette section pour remercier particulièrement Anne, qui -en plus d'être une personne d'une gentillesse incroyable- a consacré du temps à réfléchir avec moi aux problématiques de ma thèse et m'a fait profiter de son expérience, ce qui m'a probablement évité de nombreux écueils. Merci spécial à Denis également, puisqu'il me supporte depuis la licence 1, et a toujours fait preuve d'un indéfectible optimisme vis-à-vis de mes travaux.

Je n'ai pas beaucoup côtoyé les membres de l'équipe administrative, mais ils ont toujours été d'un grand soutien quand j'ai fait appel à eux. Je pense évidemment à Valérie et Sandra dont le nombre de casquettes rivalise avec leur efficacité (chapeau). Merci aussi à Isabelle et Bertrand ainsi qu'à toutes les personnes qui sont parties entre-temps (Fabienne, Valérie H, Tifenn).

Je remercie chaleureusement toutes les personnes d'Ecobio que j'ai pu croiser régulièrement dans les couloirs ou à la cafet' et avec qui j'ai pu discuter : Maryvonne, Christophe, Andréas et Françoise de la team du 3ième étage ; Cécile S, Valérie G, et Marc pour l'équipe phéno ; et dans le désordre le plus total Cécile LL, Cécile M, Cendrine, Aude, Benjamin, Jean-Pierre, Stéphanie, Vincent, Pascaline, Hector, Achim, Armelle, Armel, Diane, Kader, Michelle, et Luc, qui ont été de merveilleux collègues après avoir été (pour beaucoup) de super professeurs pendant mes années universitaires.

Un merci tout particulier pour Oscar ainsi que Romain, pour leur aide technique précieuse. Romain est arrivé après la guerre, mais Oscar a pris énormément de temps pour démêler les nœuds au cerveau que j'ai pu me faire lorsque je débutais sur les manip de biomol. Pour toutes ces astuces de paillasse, ces dons de ladder, et ces prêts de pipettes, je vous remercie (et lirai trois fois les trois tomes du Maniatis pour compenser. Deal ?).

I would also like to give many thanks to all the amazing Danish people I met in Aarhus. Johannes was the best collaborator I could have hope for, with a deep knowledge of how insects work but also full of kindness and with a sharp sense of humor. Thanks for giving me a lot of latitude and letting me work with full access to basically everything. Thanks also to Kirsten that helped me a lot in cooking tons of food for the flies. Good times. All the PhD students, post-docs, and researchers were super nice with me, showing me everything (rooms, material, shops, bars...) and I obviously want to thank (in complete disorder) Lucie, Heidi, Catherine, Jacob, Julie, Laura, Amanda, Torsten,

Palle, Mads, Roy, Pernille and Pernille. Warm thanks also to the MtG community in Aarhus, especially Henrik, for welcoming me.

Evidemment je remercie l'ensemble des doctorants et ex-doctorants d'Ecobio que j'ai côtoyé, dont bien sûr Manon, Morgane G, Kévin Hidalgo, Kévin Potard, Kévin Hoeffner, Mathieu, Nathan, Diana, Alix, Lou, Jean, Armand, Nadège, Delphine, Lorine, Eve, Alice, Morgane H, et Léa.

Remerciements particuliers pour les doc'/post-doc/ingés du 3ieme étage, tous plus chouettes les uns que les autres : Kévin Tougeron (je n'oublierai jamais le coup de main pour la biblio de mon rapport de M2 à quelques heures du rendu haha), Maxime Damien (force et honneur), Gorenka (please stop hiding corpses of unwilling PhDs in the basement, it is not hygienic), Julie (have a cool trip in the subantarctic islands!), Emma (on refait un bar quand ?), Kaïna (j'aurais le droit à des photos de Hawaii hein ! Dis ?), Laura (bon courage pour identifier tes milliers de bêtes !).

Les personnes avec qui j'ai partagé le bureau des doctorants sont la raison principale pour laquelle cette aventure de trois ans a été aussi agréable. Par ordre chronologique, un énorme merci à :

Tiphaine pour les imitations animalières à couper le souffle, et le feel good à toute épreuve. Merci pour tout ! Vraiment !

Maud, pour avoir toujours été d'accord avec moi, pour ne pas m'avoir balancé des rotifères dans la figure, et pour m'avoir épargné les coups d'épée et les mawashi-geri lasers. Tout un programme.

Alice ! Qui m'a gentiment laissé la souveraineté du bureau des doctorant-s par intérim pendant les périodes de chasse à l'escargot. J'espère que le post-thèse se passe bien et qu'on se croisera encore au détour d'un bar !

Thomas, pour avoir toléré mon snobisme musical et littéraire. Merci aussi pour l'humour d'une finesse qui jusqu'ici n'avait été atteinte que par une poignée d'initiés. Je te lègue avec confiance la direction du bureau. Evidemment, merci aussi pour le milliard de coups de mains avec les mouches...

Les stagiaires des saisons 2016, 2017, et 2018 ont amené dans le bureau de la fraîcheur, des gaffes et des histoires à raconter au coin du feu (par contre ils ont oublié quelques babioles, la notion de respect, ainsi que des heures de sommeil en partant). Merci à eux. Parmi ces stagiaires, j'ai eu le plaisir de co-encadrer Pénélope pour son M1. Elle a eu le courage de compter des milliers d'œufs, de larves, et de pupes de drosophile, tout en gardant le sourire. Ce n'est pas un mince exploit, et j'espère ne pas avoir trop forcé... (désolé !) Bonne chance pour la suite !

Merci également aux plus anciens, qu'il ne faut pas oublier (car la science avance sur les épaules d'un géant). Merci donc à Maxime Dahirel pour m'avoir partagé son savoir ancestral. Cela m'aura

permis d'être probablement un peu moins nul sur R, en rédaction et en statistiques. Merci aussi pour les fous rires, les post-its, les gâteaux, les rayures, et les bars à la cool. Pas merci pour la considération portée à mes jeux de mot.

Les copains

La thèse m'a beaucoup éloigné des copains de l'université, et je le regrette énormément. J'ai tout de même réussi à garder contact avec les meilleurs potes de l'univers que sont Charly, Manon, Laure, Sylvestre, Charlotte, Stéphanie et Simon. Des bisous pour tout le monde, et quand vous voulez on se (re)fait des vacances en bord de mer !

Je remercie évidemment tous les membres de la team MtG de Rennes, qui m'ont permis d'avoir un quota hebdomadaire de divertissement nécessaire au maintien de ma santé mentale.

Les proches

Mes parents Véronique et Alain, ainsi que mes frères, Matéo et Maodez, ont toujours été enthousiastes par rapport à ma volonté de faire de la recherche. Ils ont même essayé de s'intéresser à ce que je faisais, ce qui n'est pas universel parmi les doctorants il me semble ! Merci de m'avoir laissé faire ce que je souhaitais, et de me garder une place au calme, dans le plus bel endroit du monde.

Pour terminer, je tiens à m'excuser -sincèrement- envers toutes les mouches que j'ai utilisées au cours de mes expériences.



Titre : Influence des facteurs alimentaires et du microbiote intestinal sur la tolérance au stress chez *Drosophila melanogaster*

Mots clés : Nutrition, Microbiote, Thermotolérance, Insectes, Densité larvaire

Résumé : Un grand nombre de paramètres environnementaux affectent les insectes, et l'identification des éléments impliqués dans l'adaptation aux stress est cruciale. La nutrition est une clé de cette adaptation : elle contrôle la santé des organismes, et par conséquent affecte leur tolérance au stress. Le microbiote intestinal module lui aussi les processus physiologiques des organismes, notamment en agissant sur le phénotype nutritionnel de l'hôte. Cependant, nous ignorons encore la capacité de ce microbiote à modifier la tolérance au stress de l'hôte. A travers la manipulation du microbiote et de la nutrition, nous avons testé les effets de l'interaction microbiote-nutrition chez *Drosophila melanogaster* en nous concentrant sur la tolérance au stress. Nous avons montré une nette dépendance des mouches à l'accès aux levures pour maintenir un développement et un métabolisme normal.

A l'inverse, l'altération du développement générée par les substrats nutritionnellement pauvres ou par la surpopulation larvaire était bénéfique pour la tolérance au stress. Nous avons démontré que le microbiote peut partiellement compenser les effets d'une privation en levures, mais n'a pas d'effet quand elles sont en excès. Pour la thermotolérance, nous avons constaté que les effets du microbiote étaient très variables, et avons attribué cette variabilité à la présence ou l'absence des levures. Les assemblages de microorganismes environnementaux étaient modifiées par la composition du substrat, mais le microbiote intestinal était étonnamment stable. Ces résultats témoignent de la capacité des facteurs nutritionnels et du microbiote à moduler le développement et le phénotype des Drosophiles.

Title : Influence of dietary factors and gut microbiota on stress tolerance in *Drosophila melanogaster*

Keywords : Nutrition, Microbiota, Thermotolerance, Insects, Larval density

Abstract: A large number of environmental parameters constrain insect species, and identifying the elements involved in the adaptation to stressful conditions is crucial. Nutrition is a key factor of this adaptation: it largely controls health of organisms and therefore their stress tolerance. In addition, it is now established that microbiota (*i.e.* the whole microbial community associated with a host) is much involved in physiological processes of organisms. In particular, gut microbiota is able to modulate host's nutritional phenotype, resulting in complex dietary-dependent effects. Whether or not gut microbiota can act on stress tolerance is not clear. Using experimental manipulation of microbiota and nutrition, we investigated the outcome of the microbiota-nutrition relationship on *Drosophila melanogaster*, with a special focus on stress tolerance.

We showed a clear dependency of flies on yeasts availability to maintain a normal development, metabolism, and size. Conversely, impaired development resulting from artificial poor diets or from larval crowding was often beneficial for stress tolerance. We demonstrated that microbiota could partially compensate for the absence of yeast resource, but no effects were found in rich food contexts. We observed variable importance of microbiota on thermal tolerance, and attributed this variation to the presence or absence of yeasts. Environmental microorganisms communities were modified by diet composition but gut microbiota was surprisingly stable. Together, these findings highlight the importance of nutritional factors and microbiota in developmental and phenotypical plasticity of fruit flies.