



HAL
open science

Influences des perturbations environnementales sur l'association wMelPop-D. melanogaster

Alexis Bénard

► **To cite this version:**

Alexis Bénard. Influences des perturbations environnementales sur l'association wMelPop-D. melanogaster. Evolution [q-bio.PE]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10051 . tel-04744391

HAL Id: tel-04744391

<https://theses.hal.science/tel-04744391v1>

Submitted on 18 Oct 2024

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 CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale ED341
Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation**

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 30/09/2020, par :
Alexis Bénard

**Influences des perturbations
environnementales sur l'association
*wMelPop-D. melanogaster***

Devant le jury composé de :

**Bouchon Didier
Furla Poala
Vieira-Heddi Cristina
Zélé Flore
Kremer Natacha
Vavre Fabrice**

**Rapporteur
Rapporteure
Présidente
Examinatrice
Co-directrice de thèse
Co-directeur de thèse**

Résumé

Une majorité d'insectes vit en association avec des endosymbiotes qui peuvent avoir un impact significatif sur l'expression de leur phénotype. La balance entre les bénéfices et les coûts perçus par l'hôte conditionne la relation entre les partenaires. Ces interactions durables s'étendent donc du mutualisme, lorsque la balance penche vers les bénéfices, jusqu'au parasitisme, lorsque la balance penche vers les coûts. Cette balance peut être influencée à la fois par des déterminants génétiques hôte et/ou bactérien mais aussi par des facteurs environnementaux. La relation entre des partenaires symbiotiques n'est donc pas figée, et l'interaction peut évoluer au cours de la vie de l'hôte ou bien au fil des générations le long du continuum.

La densité symbiotique au sein d'un hôte est une caractéristique importante de la relation symbiotique, car elle est impliquée à la fois dans le succès de transmission des symbiotes et dans l'intensité des coûts et des bénéfices perçus par l'hôte. La densité symbiotique chez les insectes est généralement finement régulée de la part des partenaires, mais l'équilibre de cette régulation peut être perturbé par différentes contraintes environnementales. Mon travail de thèse a donc consisté à caractériser, d'une part, les différents déterminants et forces évolutives qui peuvent entrer en jeu dans la régulation d'une bactérie intracellulaire au sein de son hôte insecte, et d'autre part, à mesurer l'influence de perturbations environnementales sur l'équilibre de cette relation symbiotique à court terme, et leurs conséquences évolutives à moyen terme.

Nous avons choisi d'étudier la relation très particulière entre la mouche du fruit *Drosophila melanogaster* et la souche bactérienne *Wolbachia wMelPop*. En effet, *wMelPop* hyper-prolifère dans les tissus de l'hôte, ce qui peut s'avérer très coûteux ou bien très bénéfique selon le contexte environnemental. De plus, la densité symbiotique de cette souche semble corrélée au nombre de copies d'une région du génome de la bactérie nommée *Octomom*. Cette variabilité pourrait favoriser une évolution rapide de la population bactérienne sous l'influence de certaines contraintes environnementales. Par ailleurs, ce marqueur génétique permet d'évaluer les forces évolutives qui influencent la diversité des endosymbiotes à court et moyen terme.

Au cours d'une première étude nous avons identifié que la densité est principalement contrôlée par le nombre de copies d'*Octomom*, et que la dérive est une force évolutive qui influence grandement la transmission des différents variants de *wMelPop* en absence de stress environnemental. Ensuite, nous avons caractérisé à la fois la vulnérabilité de l'association et l'apport bénéfique des symbiotes en réalisant une évolution expérimentale sous contraintes environnementales, impliquant une exposition ponctuelle ou chronique à des

agents pro-oxydants et/ou viraux. Nous avons mis en évidence une très faible réponse à la sélection de la part de l'association dans des contextes environnementaux impactant pourtant la valeur sélective des hôtes et/ou les symbiotes. Nous discutons l'ensemble de ces résultats dans le cadre de la vulnérabilité des associations symbiotiques à des changements environnementaux et du potentiel adaptatif des symbioses établies dans un contexte d'environnement changeant.

Abstract

A majority of insects live in association with endosymbionts that can have a significant impact on their phenotype expression. The balance between the benefits and costs perceived by the host determines the relationship between the partners. These long-lasting interactions thus range from mutualism, when the balance is tilted towards benefits, to parasitism, when the balance is tilted towards costs. This balance can be influenced both by host and/or bacterial genetic determinants but also by environmental factors. The relationship between symbiotic partners is therefore not fixed, and the interaction may evolve during the life of the host or over generations along the continuum.

Symbiotic density within a host is an important feature of the symbiotic relationship, as it is involved in both the transmission success of symbionts and the intensity of costs and benefits perceived by the host. Symbiotic density in insects is usually tightly regulated by the partners, but the balance of this regulation can be disrupted by various environmental constraints. My thesis work consisted in characterizing the different determinants and evolutionary forces that may be at play in the regulation of an intracellular bacterium within its insect host, and in measuring the influence of environmental perturbations on the balance of this symbiotic relationship in the short term, and their evolutionary consequences in the medium term.

We chose to study the very particular relationship between the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the *Wolbachia* bacterial strain *wMelPop*. Indeed, *wMelPop* hyperproliferates in the host tissues, which can be very costly or very beneficial depending on the environmental context. Moreover, the symbiotic density of this strain seems to correlate with the number of copies of a region of the bacterial genome named *Octomom*. This variability could favor a rapid evolution of the bacterial population under the influence of certain environmental constraints. Moreover, this genetic marker allows us to evaluate the evolutionary forces that influence the diversity of endosymbionts in the short and medium term.

In a first study we identified that density is mainly controlled by *Octomom* copy number, and that drift is an evolutionary force that greatly influences the transmission of different *wMelPop* variants in the absence of environmental stress. Next, we characterized both the vulnerability of the association and the beneficial contribution of symbionts by performing experimental evolution under environmental constraints, involving point or chronic exposure to pro-oxidant and/or viral agents. We have demonstrated a very low response to selection by the association in environmental contexts that impact the selective value of the hosts and/or the symbionts. We discuss these results in the context of the vulnerability of symbiotic

associations to environmental changes and the adaptive potential of symbioses established in a changing environmental context.

Table des matières

I.	Introduction générale	8
I.1.	La symbiose est un déterminant du phénotype étendu	14
	La symbiose : un mécanisme ancien, source de diversité.....	14
	Le mode de transmission influence les relations entre partenaires symbiotiques	14
	La densité symbiotique participe à l'expression du phénotype étendu	19
	Les contraintes qui s'opposent à une régulation optimale de la population symbiotique	22
I.2.	La symbiose dans un contexte de perturbations environnementales	26
	La vulnérabilité des associations symbiotiques face aux agents stressants.	27
	L'implication de la symbiose dans la réponse au stress.....	29
	Comment étudier la relation entre stress et symbiose ?.....	33
I.3.	<i>Wolbachia</i> : un symbiote modèle approprié à l'étude des impacts des perturbations environnementales sur les associations symbiotiques.	36
	<i>Wolbachia pipientis</i>	36
	<i>Wolbachia</i> une bactérie aussi mutualiste	38
	La densité en <i>Wolbachia</i> détermine la balance coûts / bénéfices	40
I.4.	Le stress oxydatif dans les associations à <i>Wolbachia</i>	43
	Les espèces réactives de l'oxygène et l'homéostasie oxydative	43
	L'homéostasie oxydative est un paramètre déterminant de la régulation des interactions symbiotiques	45
	La balance oxydative des associations symbiotiques impliquant <i>Wolbachia</i>	46
I.5.	Le stress viral dans les associations à <i>Wolbachia</i>	48
	La protection antivirale médiée par <i>Wolbachia</i>	48
	La densité en <i>Wolbachia</i> est un facteur clé des effets antiviraux	50
	Utilisation de <i>Wolbachia</i> dans la lutte antivectorielle	51
	Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement des effets antiviraux de <i>Wolbachia</i>.....	52
	Les effets antiviraux médiés par <i>Wolbachia</i> contre le Virus C de la drosophile....	56
I.6.	Description du modèle et objectifs de la thèse.....	61
II.	Identification des déterminants de la régulation de la densité symbiotique dans l'association wMelPop-Drosophile	70
II.1.	Introduction	71
II.2.	Article 1 : <i>Wolbachia</i> load variation in <i>Drosophila</i> is more likely caused by drift than by host genetic factors	74
III.	Influence des agents stressants pro-oxydants et viraux sur l'association wMelPop - <i>Drosophila melanogaster</i>	91
III.1.	Introduction	92

III.2. Matériel et méthodes utilisées pour l'évolution expérimentale dans des conditions environnementales stressantes.....	97
III.2.1. Description générale du protocole d'évolution expérimentale	97
III.2.2. Lignées et protocoles d'élevage ; protocoles d'induction des stress	99
III.2.3. Mesure des traits d'histoire de vie	103
III.2.4. Quantification des bactériens et du titre viral	105
III.3. Article 2 : Conséquences phénotypiques et évolutives d'une infection virale sur l'association <i>wMelPop</i> -drosophile	109
III.3.1 Introduction	110
III.3.2 Matériels et méthodes	115
III.3.3 Résultats	116
III.3.4 Discussion	127
III.4. Article 3 : Influence du stress oxydatif sur l'association <i>wMelPop-Drosophila melanogaster</i> et son implication dans la réponse antivirale de l'association symbiotique	132
III.4.1 Introduction	133
III.4.2 Matériels et méthodes	137
III.4.3 Résultats	139
III.4.4 Discussion	157
IV. Discussion générale.....	166
Densité symbiotique : effets phénotypiques, régulations et réponse à la sélection	168
Symbiose et potentiel adaptatif	171
Lutte biologique	173
Conclusion et perspectives	179
V. Références bibliographiques	182
VI. Annexes.....	206
VI.1 Recommandation <i>Peer Community Journal</i> :	206
VI.2 Revue <i>Frontiers in Ecology and Evolution</i>	213

I. Introduction générale

Le phénotype regroupe l'ensemble des caractères observables d'un organisme. Il est le produit de l'interaction d'un génotype (ensemble des caractères génétiques) avec son environnement. Le phénotype des individus est modelé par des forces évolutives qui agissent à plus ou moins long terme, comme la sélection naturelle et la dérive génétique. En effet, l'héritabilité des caractères, au travers des gènes transmis au cours des générations, permet une évolution du phénotype sous le filtre de la sélection naturelle et participe ainsi à l'adaptation des organismes à de nouveaux environnements. Ces environnements dans lesquels évoluent les organismes jouent un rôle déterminant dans l'expression et l'évolution du phénotype des individus. L'environnement abiotique (e.g., température, hygrométrie, présence de polluants...) influence considérablement l'expression des gènes des individus et fait partie des pressions de sélection qui modèlent le phénotype (Lambrechts et al., 2006; Moore, 1997; Shuster et al., 2006). La composante biotique de l'environnement participe aussi à l'expression du phénotype d'un individu, en pouvant en plus en être directement à l'origine. En effet, pour la majorité des organismes, le phénotype n'est pas seulement déterminé par son propre patrimoine génétique mais aussi par celui de la multitude d'espèces vivantes avec qui il est en interaction.

Les interactions inter-espèces sont omniprésentes dans le règne du vivant, ne serait-ce que dans des relations proie-prédateur, mais aussi dans des relations plus durables dites symbiotiques. Les relations symbiotiques regroupent les associations étroites entre organismes d'espèces différentes, qui s'opèrent de façon durable à l'échelle du cycle de vie des organismes. Qu'elle soit parasitaire ou mutualiste, la relation entre les organismes influence l'expression respective de leurs gènes. L'interaction des partenaires symbiotiques participe alors à l'expression du phénotype de chacun. Ainsi, la vie en symbiose illustre le concept de *phénotype étendu* théorisé

par Richard Dawkins (1982), qui étend la définition du phénotype à tous les effets que l'expression des gènes a sur l'« environnement » de l'individu.

Dans son sens large, la symbiose comprend toute une gamme d'interactions entre organismes, que l'on peut classer en fonction de la balance coût-bénéfice sur l'hôte (le plus grand des partenaires servant généralement d'habitat pour le symbiote) (De Bary, 1879; Ewald, 1987). Dans les relations parasitaires, en détournant les ressources de leurs hôtes pour proliférer, les symbiotes imposent plus de coûts à leur hôte qu'ils ne leur apportent de bénéfices. Dans les relations mutualistes, les bénéfices perçus par l'hôte contrebalancent les coûts imposés par la présence des symbiotes et améliorent la valeur sélective de chacun des partenaires. Entre ces extrêmes, se trouve tout un continuum d'interactions hôte-symbiote (Figure 0.1.a), le long duquel les relations symbiotiques peuvent se déplacer en fonction des conditions environnementales sur des temps courts (incluant l'échelle de la vie de l'hôte), mais aussi à une échelle de temps évolutive plus longue (Lin and Koskella, 2015; Tipton et al., 2019). En d'autres termes, la relation entre les partenaires est susceptible d'évoluer vers plus ou moins de coûts (ou de bénéfices) au cours de la vie des organismes et des générations.

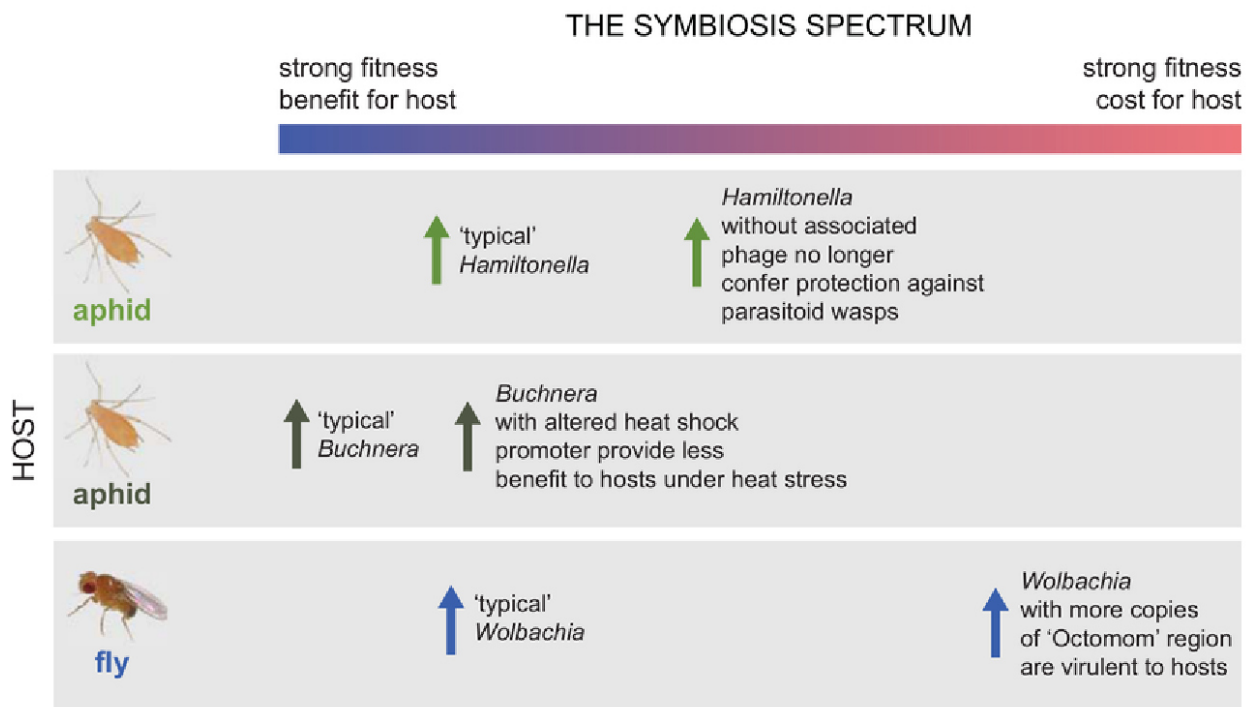


Figure 1 | La symbiose est un continuum d'interactions. Les coûts et les avantages de la symbiose pour les hôtes ne sont pas bimodaux mais s'étendent sur un continuum. Le rapport entre les avantages et les coûts est influencé à la fois par les conditions environnementales et par le génotype du symbiote. Par exemple, la bactérie *Hamiltonella defensa* augmente la résistance des pucerons aux guêpes parasitoïdes, tout en exprimant un coût physiologique assez important. L'absence de parasitoïdes dans l'environnement ou la perte de bactériophages APSE* peut rapidement conduire à une perte de la protection conférée par *Hamiltonella* et ne plus révéler que le côté 'parasitaire' de l'interaction. De même, chez les pucerons, *Buchnera aphidicola* est un symbiote bactérien qui fournit à ses hôtes des ressources nutritionnelles essentielles. Cependant, les altérations du promoteur « *heat shock* » chez *Buchnera* réduisent les avantages de la symbiose pour les hôtes à des températures élevées. L'amplification d'une région du génome de *Wolbachia* connue sous le nom d'Octomom augmente les coûts associés à la présence de la bactérie en réduisant la durée de vie de ses hôtes. Figure et légende issues de la revue de N. M. Gerardo (2015).

L'étude de la symbiose a récemment pris un nouveau tournant avec les études dédiées au microbiote, terme qui représente l'ensemble des communautés microbiennes d'un tissu/organe au sein d'un organisme. Le microbiote peut significativement impacter les aptitudes de l'hôte à survivre, en remplissant des fonctions essentielles à l'échelle de l'organe, comme le font le microbiote intestinal des animaux ou le microbiote racinaire des plantes. L'impact fonctionnel et phénotypique de certaines relations symbiotiques est si important que l'on ne peut plus considérer

les organismes qui vivent en interaction comme dissociables. Le concept d'holobionte élargit notre considération des organismes pour inclure le consortium de micro-organismes qui vivent dans, sur, et autour de l'hôte. Cette théorie de l'holobionte considère cet ensemble {hôte + communautés symbiotiques} comme une seule et même unité de sélection, où les forces évolutives agissent de concert sur les partenaires symbiotiques (Theis et al., 2016). Cette unité de sélection unique que constitue l'holobionte sous-entend que l'interaction entre les génomes des hôtes et de leurs symbiotes participe à la fois au succès reproducteur des partenaires symbiotiques, à leurs réponses aux contraintes environnementales et à leurs capacités d'adaptation dans des environnements changeants (Roughgarden et al., 2017). Cependant, le concept d'holobionte est un sujet de débat au sein de la communauté scientifique car d'une part, il est difficile de déterminer une limite concrète entre l'organisme et son environnement biotique, et d'autre part, car il existe de potentiels conflits entre les partenaires symbiotiques au sein de l'hôte, et/ou entre les différents partenaires symbiotiques et l'hôte (Douglas and Werren, 2016; Madhusoodanan, 2019). Quand bien même il existe une controverse quant à la conceptualisation des interactions symbiotiques, la conjugaison des génomes des organismes en interaction détermine en grande partie le phénotype, la valeur sélective et la trajectoire évolutive de ces organismes dans un environnement donné (Foster et al., 2017).

L'établissement du phénotype étendu des organismes dépend donc de plusieurs facteurs qui comprennent les relations avec d'autres organismes (interactions symbiotiques), les contraintes environnementales, et différentes forces évolutives (sélection et dérive). En perturbant l'équilibre symbiotique par la modification des contraintes environnementales et par le transfert de variants symbiotiques entre différentes lignées d'hôtes, ce travail de thèse cherche à

caractériser les influences de chacun des partenaires et de l'environnement dans l'établissement du phénotype de l'holobionte. L'approche expérimentale mise en place au cours cette thèse permet aussi de mieux caractériser l'évolution des partenaires dans un contexte de perturbations environnementales. Pour introduire les notions inhérentes à ce champ de recherche, l'implication des symbiotes dans l'établissement du phénotype sera abordée en première partie. Ensuite, les conséquences évolutives de la vie en symbiose et l'impact des perturbations environnementales sur le phénotype étendu seront développées, de manière générale en seconde partie et de manière détaillée dans les associations symbiotiques impliquant *Wolbachia* en troisième partie. Enfin, la problématique générale du travail de thèse sera présentée en quatrième partie de cette introduction.

I.1. La symbiose est un déterminant du phénotype étendu

La symbiose : un mécanisme ancien, source de diversité

Les organismes eucaryotes hébergent une large diversité de symbiotes acquis plus ou moins récemment (à l'échelle de l'évolution), tels que des vers parasites, des bactéries, des champignons ou encore des virus (Buchner, 1965; O'Neill et al., 1997; Thomas et al., 2005). De manière générale, l'hôte apporte un bénéfice au symbiote en lui prodiguant un habitat ou encore des ressources nutritives. Les symbiotes, en détournant les ressources et la machinerie cellulaire de l'hôte, peuvent s'avérer coûteux pour l'hôte, ce qui peut avoir comme conséquence de réduire leur fenêtre de transmission à un nouvel hôte. L'accès à un nouvel hôte constitue alors un défi évolutif pour les symbiotes pour se maintenir dans les populations d'hôtes. Ainsi, toute modification du phénotype - chez l'hôte (induite ou non par les symbiotes) ou chez les symbiotes - favorisant la transmission des symbiotes à un nouvel hôte est une cible potentielle de la sélection naturelle. Les pressions de sélection qui aboutissent au maintien des parasites dans les populations d'hôtes ont mené à l'émergence de différents modes de transmission chez les symbiotes. Il s'avère que le mode de transmission des symbiotes est un déterminant majeur des histoires de vie des symbiotes et de la trajectoire évolutive des relations hôte-symbiote (Alizon et al., 2009; Ewald, 1987).

Le mode de transmission influence les relations entre partenaires symbiotiques

Certains symbiotes peuvent être acquis directement depuis l'environnement (transmission horizontale), d'autres peuvent être transmis par un organisme tiers (transmission vectorielle) et d'autres de parents à descendants (transmission verticale). Dans le cas des symbioses à transmission verticale, les symbiotes

dépendent du succès reproducteur de leur hôte pour leur propre transmission. Ainsi, des phénotypes moins coûteux pour l'hôte sont attendus : plus la valeur sélective de l'hôte est forte, plus la fenêtre de transmission des symbiotes est grande (Ewald, 1987; Fine, 1975). A l'inverse, dans le cas de transmission horizontale où la valeur sélective des symbiotes corrèle moins avec celle des hôtes, on s'attend à une virulence accrue (Alizon et al., 2009). Une étude sur les protozoaires *Paramecium caudatum*, qui présentent un mode de transmission mixte, confirme ces prédictions. En contraignant ces symbiotes à un mode de transmission particulier par le biais d'expériences d'évolution expérimentale, on peut observer des positionnements le long du continuum mutualisme-parasitisme totalement opposés : en contraignant les protozoaires à une transmission verticale, ils évoluent vers l'avirulence ; à l'inverse, leur virulence augmente s'ils sont contraints à une transmission horizontale (Magalon et al., 2010).

Chez les symbioses à transmission verticale, les symbiotes bénéficient directement de la reproduction de leur hôte. Ainsi une contribution positive à la valeur sélective de l'hôte leur profite aussi. Dans ce cas où les valeurs sélectives sont positivement corrélées, on parle d'alignement des intérêts des partenaires symbiotiques. Les symbioses nutritives illustrent bien l'évolution vers le mutualisme des symbioses à transmission verticale. Certains arthropodes phloémophages, comme les pucerons, ont des régimes dépourvus de nombreux acides aminés essentiels et ne possèdent pas les voies de biosynthèse permettant la synthèse de ces derniers (Akman Gündüz and Douglas, 2012; Dale and Moran, 2006; Douglas, 2009; Wu et al., 2006). Cependant, on retrouve dans les tissus de la plupart des espèces de puceron la bactérie *Buchnera aphidicola*, qui possède ces voies de biosynthèse et complémente ainsi le régime alimentaire pauvre de ses hôtes en échange de ressources nécessaires à sa prolifération. De manière similaire, chez les

nématodes et les arthropodes hématophages, on retrouve des bactéries qui viennent compléter les repas sanguins dépourvus de certains nutriments comme les vitamines B (Aksoy, 2000; Duron et al., 2018; Hosokawa et al., 2010; Sironi et al., 1995; Smith et al., 2015). Ici, les symbiotes favorisent leur transmission en augmentant la capacité reproductive de leurs hôtes. Sous le crible de la sélection, cet alignement des intérêts chez les symbioses à transmission verticale limite l'évolution des associations symbiotiques vers la pathogénie : un symbiote qui a des effets négatifs sur le succès reproductif de ses hôtes limiterait par conséquent sa propre transmission et ne serait ainsi pas sélectionné. Bien que les symbioses nutritionnelles illustrent parfaitement cette particularité d'alignement des intérêts, il peut être observé chez d'autres symbioses mutualistes qui reposent sur d'autres mécanismes (protection, zoochorie) favorisant la valeur sélective de leurs hôtes (Oliver and Moran, 2009; Schupp, 1993).

L'évolution vers le mutualisme n'est pas toujours la seule issue des symbioses à transmission verticale. Certains endosymbiotes à transmission maternelle entretiennent une relation parasitaire avec leur partenaire symbiotique. Pour les bactéries intracellulaires comme *Wolbachia* ou *Spiroplasma*, qui sont transmises de générations en générations dans les œufs des insectes, les mâles sont des impasses évolutives pour la transmission des symbiotes à la génération suivante. L'induction de différents phénotypes favorisant les *sex-ratios* en faveur des femelles a ainsi été sélectionnée chez ces bactéries (Giorgini et al., 2010; Hurst et al., 1999; Rigaud et al., 1999; Weeks and Breeuwer, 2001). Alternativement, l'incompatibilité cytoplasmique que ces bactéries peuvent aussi induire a pour conséquence de limiter la valeur sélective des femelles non-colonisées par les bactéries en limitant leur succès reproducteur, empêchant la production d'une descendance viable lors de croisements

avec des mâles infectés. Ces stratégies permettent à ces bactéries d'atteindre de fortes prévalences dans les populations d'hôtes, bien qu'elles ne soient pas bénéfiques pour les hôtes, voire même qu'elles sélectionnent des phénomènes de résistance à l'incompatibilité cytoplasmique chez les hôtes (Bourtzis et al., 1996; Engelstädter and Hurst, 2009 ; Stouthamer et al. 2010). Les hôtes et leurs symbiotes présentent alors des intérêts divergents démontrant un conflit évolutif potentiel entre les partenaires.

Chez les symbioses à transmission horizontale, les intérêts des partenaires symbiotiques divergent de façon plus marquée que chez les symbioses à transmission verticale. Chez ces symbioses, il existe un compromis entre la virulence et la transmission (en anglais « *trade-off hypothesis* »). Cette théorie stipule que la virulence est une conséquence inévitable de l'exploitation de l'hôte par les symbiotes et que le succès de transmission est étroitement lié au niveau d'exploitation des ressources de l'hôte (Alizon et al., 2009). Plus les symbiotes exploitent les ressources de leur hôte, plus leurs capacités de multiplication augmentent et ainsi leurs chances de transmission augmentent. Cependant, plus l'exploitation des ressources est grande, en parallèle de la prolifération des symbiotes, plus l'espérance de vie des hôtes diminue. L'avantage en termes de transmission que tirent les symbiotes d'une augmentation de l'exploitation des ressources de l'hôte est alors contrebalancé par les coûts sur la longévité de l'hôte, qui réduisent de fait la fenêtre de transmission des symbiotes. Dans ce cadre, les symbiotes présentent souvent un optimum de densité qui maximise leur transmission tout au long de la durée de vie des hôtes (Alizon et al., 2009; Anderson and May, 1982; Ewald, 1983).

En conséquence de ce compromis, les phénotypes induits par les symbiotes à transmission horizontale qui maximisent l'accès à de nouveaux hôtes sont favorables

à leur dissémination et les déterminants symbiotiques responsables de l'expression de ces phénotypes chez les hôtes sont la cible de la sélection naturelle. De nombreuses modifications du phénotype des hôtes par des parasites à transmission horizontale conduisent à des altérations morphologiques ou comportementales chez l'hôte. C'est notamment le cas des parasites au cycle de vie complexe (hétéroxène) qui produisent des modifications phénotypiques chez leurs hôtes qui ont pour conséquences d'augmenter la vulnérabilité des hôtes à la prédation favorisant ainsi la transmission des parasites à de nouveaux hôtes. Par exemple, les sporocystes du parasite digénien *Leucochloridium macrostomum* 'transforment' les antennes de l'escargot *Succinea putris* en « lampes clignotantes colorées » (Wesołowska and Wesołowski, 2014), tandis que les fourmis arboricoles tropicales parasitées par des nématodes (*Cephalotes atratus*) ressemblent à des fruits mûrs de la forêt tropicale (Yanoviak et al., 2008). Ces modifications morphologiques conduisent finalement à une ingestion accrue du parasite par les oiseaux, les hôtes finaux de leur cycle de vie. Un autre exemple est celui du protozoaire ubiquitaire *Toxoplasma gondii* qui, en modifiant le comportement des rongeurs infectés, augmente les chances qu'ils soient la proie de félinés (Webster, 2007). Ces altérations morphologiques et comportementales résultent de fortes pressions de sélection favorisant la transmission des symbiotes, depuis son réservoir d'hôtes intermédiaires à son hôte final, où la reproduction sexuelle peut avoir lieu et le cycle de vie être achevé. D'autres exemples spectaculaires de modifications phénotypiques sont aussi observés chez les parasites aux cycles de vie direct (monoxène). Les vers nématomorphes qui infectent certains orthoptères sont capables de 'pousser au suicide par noyade' leurs hôtes, en produisant des molécules effectrices qui agissent directement sur le système nerveux

central de l'hôte. Le parasite mature quitte ensuite son hôte pour vivre et se reproduire en milieu aquatique (Biron et al., 2005).

Ces modifications des phénotypes des hôtes sous l'influence des symbiotes favorisent la transmission des symbiotes d'hôte à hôte, qu'ils soient de la même espèce ou non. De manière générale, les symbiotes tirent un bénéfice des modifications phénotypiques induites chez leurs hôtes, tandis que, chez les hôtes le bilan de la balance bénéfice-coûts dépend fortement de la stratégie des symbiotes qui est bien souvent déterminée par leur mode de transmission. Or la relation hôte-symbiote dépend aussi d'autres contraintes notamment celles liées à l'abondance relative des symbiotes chez leur hôtes.

La densité symbiotique participe à l'expression du phénotype étendu

La balance coûts-bénéfices associée à la présence d'un symbiote et l'efficacité de la transmission des symbiotes dépendent souvent de la densité symbiotique (May et Anderson 1979). Du fait que la prolifération des symbiotes est directement associée à un détournement des ressources de l'hôte, les coûts imposés par la présence de parasites sont directement liés à leur quantité dans les tissus des hôtes. Lorsque la forte abondance des symbiotes dans les tissus des hôtes induit une réduction de la valeur sélective des hôtes, la fenêtre de transmission de ces symbiotes peut donc être réduite. Dans les symbioses mutualistes, l'abondance des symbiotes dans les tissus des hôtes corrèle souvent aux bénéfices perçus par les hôtes. Ainsi, une forte densité symbiotique peut être associée à un élargissement de la fenêtre de transmission des symbiotes par l'amélioration de la valeur sélective de leur hôte. La densité symbiotique joue donc un rôle central sur la relation symbiotique, et sa régulation résulte souvent

d'un compromis adaptatif entre les coûts et les bénéfices perçus par l'hôte, et la transmission des symbiotes.

Étant donné l'importance de la densité dans l'équilibre des relations symbiotiques, l'abondance en symbiotes devrait être soumise à un contrôle précis de la part de chacun des partenaires de l'association. Bien que les mécanismes impliqués dans la régulation des effectifs de la population symbiotique varient en fonction des espèces en interaction, on peut tout de même identifier des systèmes de contrôle présents chez les hôtes mais aussi chez les symbiotes. Ces mécanismes chez l'hôte sont, par exemple, des régulations immunitaires qui ont pour conséquence de limiter la prolifération des symbiotes. Cette régulation immunitaire peut prendre forme chez l'hôte par la synthèse de peptides antimicrobiens ou encore par la déstabilisation de la balance oxydative des cellules (Kaltenpoth et al., 2014; Koehler et al., 2013; McFall-Ngai et al., 2010; Pan et al., 2012; Ratzka et al., 2013; Wang et al., 2009). Le contrôle de la prolifération de la population symbiotique de la part de l'hôte peut aussi s'effectuer par un apport contrôlé de nutriments aux symbiotes. À titre d'exemple, chez les plantes de la famille des Fabacées, l'infection bactérienne des nodosités (organes racinaires spécialisés dans l'échange de nutriments entre les plantes et les bactéries fixatrices d'azote) est contrôlée par la capacité des plantes à approvisionner graduellement les nodules en oxygène et nutriments nécessaires à la croissance bactérienne dans les différents compartiments de cet organe. Un nodule est compartimenté comme suit : une zone méristématique I suivie des zones II et III impliquées respectivement dans la prolifération bactérienne et l'assimilation d'azote et enfin une zone IV de sénescence bactérienne. La zone méristématique, étant réservée à la croissance tissulaire de l'organe, n'est pas infectée, ce qui limite les coûts associés à la présence de bactéries dans les tissus. Au contraire, le niveau d'infection est élevé

dans les zones II et III de l'organe, ce qui augmente les bénéfices fournis par la bactérie via la production d'azote assimilable par les cellules de l'hôte, essentielle au développement végétal. Ainsi, dans ces zones II et III spécialisées dans les échanges entre les partenaires symbiotiques, l'apport en nutriments est important comparativement aux autres zones I et IV (Rodríguez-Haas et al., 2013). Un apport contrôlé en Oxygène (et nutriments ?) par la plante favorise ainsi les symbiotes fixateurs d'azote et sanctionne les symbiotes dits « tricheurs » (détournant les ressources de l'hôtes sans apporter de bénéfices) (Kiers et al., 2003; Rodríguez-Haas et al., 2013).. Les tissus des hôtes sont donc le siège de régulations fines de l'interaction symbiotique via le contrôle de la densité sous l'influence du génome de l'hôte mais cette régulation peut aussi être en partie influencée par le génome du symbiote.

En effet, les symbiotes peuvent aussi participer à la régulation de leur propre densité, cependant les mécanismes sous-jacents restent assez peu décrits. Des particularités génétiques de certaines souches symbiotiques semblent être à l'origine de ces mécanismes (Chrostek et al., 2013; Ijichi et al., 2002), comme pour les différentes souches de *Wolbachia* qui infectent différentes espèces hôtes de guêpes parasitoïde. Chez *Leptopilina heterotoma* et *Asobara tabida*, il semblerait que le mécanisme de régulation de la densité en *Wolbachia* soit spécifique à la souche bactérienne. En effet, les quantités relatives des différentes souches de *Wolbachia* diffèrent au sein d'individus coinfectés (Mouton et al., 2003, 2004). La régulation de la densité symbiotique, qu'elle soit sous contrôle de l'hôte ou des symbiotes, constitue un enjeu important pour la stabilité des associations symbiotiques. Cependant, des limites à une régulation optimale de la population symbiotique existent et peuvent influencer de façon significative les relations entre les partenaires symbiotiques.

Les contraintes qui s'opposent à une régulation optimale de la population symbiotique

L'optimalité de la régulation de la densité en symbiotes au sein d'un hôte peut être différente pour l'hôte et pour le symbiote. Parfois, du point de vue des hôtes, une quantité limitée de symbiotes dans leurs tissus suffit à maximiser leur succès reproductif, tandis que du point de vue des symbiotes, une quantité plus importante dans les tissus de l'hôte est nécessaire pour assurer leur transmission. La variation de la densité symbiotique dans les populations naturelles pourrait alors refléter un processus antagoniste, où les hôtes et les symbiotes luttent pour le contrôle de la densité des symbiotes. Par exemple, la bactérie intracellulaire *Regiella insecticola*, qui protège les pucerons *Acyrtosiphon pisum* contre des parasites fongiques, présente des taux de transmission efficaces lorsqu'elle atteint de fortes densités dans les tissus de ses hôtes. Or, cette forte densité est uniquement bénéfique pour la transmission des symbiotes, car elle n'améliore pas davantage la protection que confère cette bactérie à de plus faibles densités (Parker et al., 2021). Dans cet exemple, la protection de l'hôte contre des ennemis naturels nécessite une densité faible en symbiotes, tandis que la transmission des symbiotes est optimale lorsque la densité est plus élevée, mais donc coûteuse pour l'hôte. A partir de cet exemple, on peut s'attendre chez l'hôte à la sélection de facteurs qui tendent à limiter de façon active la prolifération des bactéries et qu'à l'inverse, on observe la sélection chez les bactéries de facteurs qui favoriseraient un optimum de densité plus fort.

La **dérive** peut aussi écarter la densité symbiotique d'une régulation optimale. Le concept de dérive génétique, qui implique des variations aléatoires des fréquences alléliques dans une population pouvant aller jusqu'à la fixation, peut aussi s'appliquer aux relations symbiotiques. En effet, sous l'influence de la dérive, la transmission de certains symbiotes à transmission horizontale à un autre hôte peut être empêchée ou

bien favorisée. Cette force évolutive est notamment le moteur principal de la diversité spécifique en bactéries fixatrices d'azotes rencontrée chez les plantes légumineuses du genre *Aspalathus* (Ramoneda et al., 2020). Dans ce système, les hôtes ne possèdent pas de mécanisme leur permettant le choix de leurs partenaires, ainsi la dérive peut agir sur la diversité spécifique des symbiotes qui coloniseront l'hôte. Ce concept de dérive peut aussi être appliqué aux symbioses à transmission verticale. Dans le cas où la densité symbiotique est au moins en partie sous déterminisme génétique, la dérive peut alors influencer les niveaux de densité symbiotique chez les hôtes par une transmission aléatoire - d'une génération à l'autre - des caractères génétiques impliqués dans la régulation de la densité. Chez les cochenilles, l'abondance relative de leur symbiote obligatoire varie aléatoirement au cours des générations sans qu'il n'y ait d'avantage particulier en termes de valeur sélective pour les cochenilles ayant de fortes ou de faibles densités, alors même qu'elles évoluent dans des conditions environnementales contrôlées (Parkinson et al., 2017). Ces variations observées au sein même d'une population d'hôte sont symptomatiques d'une absence de mécanisme de contrôle ou de sanction des variants symbiotiques plus ou moins prolifératifs. En absence de contrôle lors de la transmission des symbiotes, ils seront transmis à la génération suivante de façon aléatoire, et leur abondance à la génération suivante sera généralement proportionnelle à la quantité relative de chaque variant symbiotique dans les tissus germinaux de l'hôte donneur. Ainsi, les différents individus qui constituent une population d'hôte peuvent alors être colonisés par des symbiotes qui présentent des génotypes et des niveaux de densité variables.

Les symbiotes intracellulaires à transmission verticale sont aussi soumis à deux **niveaux de sélection conflictuels** qui peuvent influencer l'abondance relative des

symbiotes dans les tissus de l'hôte. La sélection inter-hôte concerne le succès de transmission des symbiotes d'une génération à l'autre d'hôte tandis que la sélection intra-hôte concerne la compétition entre variants symbiotiques tout le long de la vie d'un seul hôte (Figure I.1.a). On s'attend à ce que la *sélection inter-hôte* favorise les symbiotes qui se transmettent le mieux d'une génération à l'autre, autrement dit, les symbiotes qui minimisent les coûts pour l'hôte tout en maintenant un taux de transmission élevé. A l'inverse, on s'attend à ce que la *compétition intra-hôte* favorise les symbiotes les plus virulents au cours de la vie d'un individu hôte, car ils prolifèrent plus vite que les autres variants (Alizon et al., 2013). Ainsi, dans le cas d'une population symbiotique présentant une certaine hétérogénéité génétique impliquant des niveaux de densité variables, la sélection inter-hôte tend à limiter la prolifération (favorisant ainsi la valeur sélective de l'hôte) de la population symbiotique tandis que la sélection intra-hôte tend à maximiser la prolifération des symbiotes (favorisant ainsi la virulence). Ce conflit entre les différents niveaux de sélection peut donc aboutir à des intérêts antagonistes entre les partenaires symbiotiques, qui constituent une contrainte à une régulation optimale de la densité symbiotique en ayant des conséquences sur le phénotype de l'hôte (O'Neill et al., 1997).

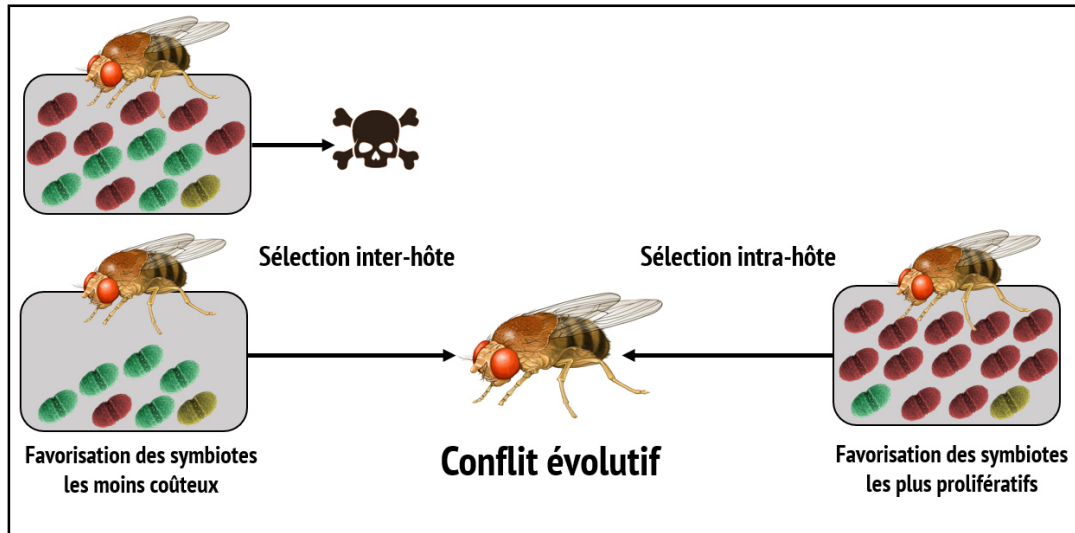


Figure 1.1 | Le conflit évolutif entre deux niveaux de sélection agissant sur la densité symbiotique. La sélection inter-hôte est une pression de sélection qui s'opère entre les hôtes. La compétition entre les hôtes sélectionne les phénotypes les plus longévifs et féconds. Ainsi les symbiotes qui impactent le moins négativement la valeur sélective de leur hôte possèdent une plus large fenêtre de transmission et sont alors plus susceptibles d'envahir la population d'hôte. La compétition intra-hôte concerne la course à la prolifération dans les tissus d'un seul et même individu. Ainsi les symbiotes possédant les capacités de réplication les plus rapides seront les plus représentés tout au long de la vie de l'hôte. Ces forces évolutives aux conséquences opposées sur la densité symbiotique sont une part du compromis adaptatif qui s'opère pour une régulation optimale de la densité symbiotique.

Outre ces contraintes, **l'environnement** des associations symbiotiques peut aussi s'avérer être un facteur majeur influençant l'établissement (ou non) d'un optimum de densité symbiotique. En effet, les fluctuations de pression de sélection liées à des environnements changeants peuvent altérer l'efficacité de la sélection d'un optimum de densité, ou bien constituer un nouveau défi évolutif pour les associations symbiotiques. Ces contraintes impactant l'expression du phénotype étendu seront développées dans le chapitre suivant, qui les explicite au travers des impacts des perturbations environnementales sur les associations symbiotiques.

I.2. La symbiose dans un contexte de perturbations environnementales

Les changements globaux actuels représentent un risque important d'érosion de la biodiversité terrestre et *in fine* un danger pour le maintien des activités humaines. Ainsi, les perturbations écologiques induites par ces changements environnementaux suscitent la mobilisation de la communauté scientifique afin de mieux comprendre leurs impacts et de proposer des solutions pour les contourner. Étant donné le caractère ubiquitaire de la vie en symbiose, l'étude des perturbations environnementales et de leurs effets dans le cadre des associations symbiotiques est cruciale pour comprendre à la fois comment les organismes sont impactés et comment ces perturbations agissent sur la stabilité des associations, mais aussi afin de caractériser l'implication potentielle de la symbiose dans l'adaptation des organismes à ces changements. Les perturbations environnementales peuvent induire des modifications chez les organismes qui peuvent être considérées comme un stress dès lors qu'un impact réel ou potentiel est attendu sur la valeur sélective des organismes après exposition. Le stress se différencie donc de la réponse au stress, qui est considérée comme l'altération physiologique et/ou comportementale des organismes soumis à des perturbations environnementales. L'agent stressant constitue quant à lui la perturbation environnementale en elle-même, qui peut être de nature abiotique ou biotique pouvant varier en intensité et en fréquence d'exposition. Pour clarifier : l'agent stressant est l'élément déclencheur qui induit la réponse au stress représentant l'altération de l'homéostasie d'un organisme, et le stress s'identifie comme la conséquence finale de la perturbation sur la valeur sélective de l'organisme. La nature de l'agent stressant présente des spécificités qui peuvent entraîner des conséquences directes sur le stress et la réponse au stress. En effet, un agent stressant biotique

diffère d'un agent stressant abiotique car il peut modifier le stress et sa réponse par sa capacité à coévoluer avec les organismes qui lui font face. Ensuite, les dynamiques d'exposition aux agents stressant biotiques ne répondent pas aux mêmes contraintes que celles des agents stressants abiotiques. À l'instar des perturbations environnementales abiotiques, les agents stressants biotiques sont caractérisés comme des symbiotes pathogènes qui sont donc soumis aux mêmes contraintes de transmission (développées dans le chapitre précédent). La transmission de l'agent pathogène influence ainsi la fréquence à laquelle les organismes seront exposés à ce dernier.

La vulnérabilité des associations symbiotiques face aux agents stressants.

Il est difficile de généraliser les effets des agents stressants sur l'ensemble des associations symbiotiques, car ces effets dépendent de nombreux facteurs propres à la nature même de l'agent stressant, de son intensité et de son occurrence, mais aussi de facteurs liés aux caractéristiques particulières de l'association symbiotique soumise au stress. Cependant, deux altérations majeures sont observables dans les relations symbiotiques à la suite d'une exposition à des agents stressants. La première est la déstabilisation de la communauté symbiotique, tant sur la représentation spécifique au sein de la communauté que sur la diversité génétique de chacune des espèces présentes. En effet, certains agents stressants peuvent perturber l'immunité de l'hôte, ce qui peut avoir pour conséquence de modifier le contrôle des symbiotes, et/ou de permettre à des symbiotes opportunistes d'envahir l'hôte (de Lorgeril et al., 2018; Williams et al., 2016). Aussi, ces perturbations de l'immunité de l'hôte peuvent modifier la diversité intraspécifique des symbiotes qui colonisent l'hôte, et ainsi renforcer les conflits qui existent entre les différents niveaux de sélection (Silverstein et al., 2015; Zaneveld et al., 2017). La seconde altération observable sur les associations

symbiotiques est une modification de l'abondance relative en symbiote dans les tissus de l'hôte. Ce changement de densité symbiotique peut être lié directement à l'impact de l'agent stressant sur la population symbiotique. Par exemple des doses subléthales d'insecticides ou de pesticides peuvent diminuer directement la densité des symbiotes comme *Buchnera* chez le puceron (Enders and Miller, 2016) ou encore comme *Wolbachia* chez la drosophile (Monnin et al., 2016). Les agents stressants peuvent aussi agir indirectement sur la densité symbiotique en modifiant l'optimum de densité pour chacun des partenaires ou bien d'un seul des partenaires. Par exemple, les variations de températures peuvent entraîner une modification du rhéostat de la sphingosine chez les anémones du genre *Aiptasia* en augmentant la production de diphosphatase (SPPase), ce qui favorise l'apoptose et donc l'élimination des algues dinoflagellés symbiotiques (Detournay and Weis, 2011; Sawyer and Muscatine, 2001). Dans cet exemple, les effets de réduction de la densité symbiotique ont pour conséquence de réduire les coûts associés à la présence des symbiotes à la suite d'un changement d'optimum de densité pour l'hôte, car cette réduction des effectifs symbiotiques favorise la résilience de l'hôte lors d'une élévation de température.

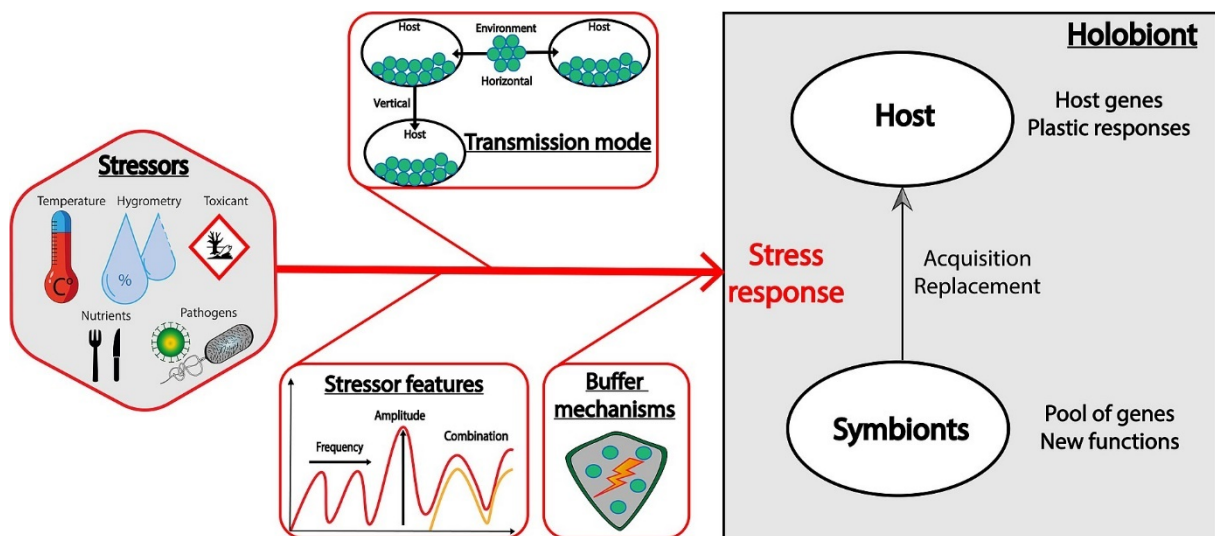


Figure I.2 | Facteurs pouvant influencer la réponse au stress de l'holobionte. La réponse de l'holobionte aux facteurs de stress est difficile à prévoir car de nombreux facteurs peuvent être sous sélection. Cela inclut les gènes de résistance de l'hôte et les mécanismes plastiques, mais aussi l'acquisition de symbiotes qui peuvent constituer un pool de gènes avec de nouvelles fonctions. Sont décrits ici certains facteurs clés qui peuvent favoriser l'adaptation de l'hôte ou des symbiotes aux agents stressants : (1) les caractéristiques de l'agent stressant, telles que sa fréquence ou son amplitude, mais aussi sa combinaison avec un autre agent stressant qui peut conduire à une interaction additive, synergique ou antagoniste, (2) le mode de transmission des symbiotes, et (3) la spécificité et l'efficacité du mécanisme protecteur, et la balance entre les bénéfices et les coûts. Figure issue de la revue coécrite avec mes directeurs de thèse (2020).

L'implication de la symbiose dans la réponse au stress.

Bien que les symbiotes soient impactés directement par les effets des agents stressants ou indirectement *via* la déstabilisation de l'immunité de leur hôte, ils peuvent aussi jouer un rôle important dans le type de réponse au stress que développeront les hôtes lorsqu'ils sont exposés. Les agents stressants, en perturbant l'homéostasie symbiotique, peuvent déséquilibrer la balance coûts/bénéfices associée à la présence des symbiotes et ainsi opérer une transition le long du continuum mutualisme-parasitisme chez certaines associations symbiotiques. Dans certains cas, les symbiotes s'avèrent être une circonstance aggravante à la condition stressante que subissent les hôtes. Par exemple, la sensibilité des coraux aux températures élevées résulte d'une transition des algues *Symbiodinium* du mutualisme vers le parasitisme. L'élévation de température altère le métabolisme de chacun des partenaires de cette association : l'algue *Symbiodinium* n'ayant plus la capacité d'apporter des ressources énergétiques à son hôte par l'inhibition de sa chaîne photosynthétique, elle devient un parasite nutritionnel pour son hôte en exploitant ses ressources sans contrepartie (Baker et al., 2018). La température peut aussi déstabiliser la balance entre les coûts et les bénéfices d'une association en influençant directement les niveaux de densité en symbiotes. Certaines souches de *Wolbachia* sont particulièrement sensibles à la température, une augmentation de température peut se traduire par une augmentation significative de la densité bactérienne. Cette augmentation de la densité bactérienne

a pour conséquence d'accentuer les coûts métaboliques associés à la présence du symbiote, en ayant un impact négatif sur la survie des insectes infectés (Mouton et al., 2006; Reynolds et al., 2003). Dans ces deux exemples, l'agent stressant est à la source d'une transition le long du continuum, soit en modifiant la physiologie du symbiote, soit en augmentant la densité symbiotique. Dans chacun de ces cas, les coûts physiologiques imposés par les symbiotes sont exacerbés en condition de perturbation environnementale, la symbiose est alors un facteur de sensibilité aux agents stressants.

L'hôte en lui-même ne possède pas forcément de vulnérabilité aux agents stressants mais ses symbiotes peuvent y être très sensibles, provoquant ainsi une sensibilité 'par procuration'. Cette situation est d'autant plus flagrante lorsque le symbiote sensible entretient une relation obligatoire avec son hôte. Par exemple, les symbiotes obligatoires *Buchnera* hébergés par les pucerons s'avèrent très sensibles aux élévations de température, ce qui provoque une défaillance dans la complémentarité nutritive qu'ils apportent à leur hôte (Lu et al., 2014). Les températures élevées ont pour impact de diminuer le nombre de bactériocytes qui abritent ces symbiotes obligatoires (Chen et al., 2009). Cependant, des symbiotes facultatifs du puceron comme *Serratia symbiotica* préviennent l'élimination des bactériocytes, protégeant ainsi *Buchnera* et par conséquent ses hôtes contre le stress thermique. La prévalence des *Serratia* dans les habitats fréquemment soumis à des élévations de température peut alors atteindre près de 80% (Koga et al., 2003; Montllor et al., 2002; Russell and Moran, 2006).

La symbiose n'est donc pas toujours une circonstance aggravante à la situation de l'hôte en condition de stress, et peut apporter une certaine résilience aux organismes soumis à des agents stressants. Cette aptitude à retrouver l'état initial lors

d'une perturbation environnementale conférée par des symbiotes mutualistes peut alors avoir un impact sur les capacités d'adaptation des hôtes sur de longues échelles de temps. Les organismes aérobies, actuellement majoritaires, résultent de l'adaptation des espèces anaérobies aux nouvelles conditions environnementales de la grande oxygénation qui date d'il y a 2,4 milliards d'années avant notre ère. L'endosymbiose à l'origine des mitochondries actuelles ayant eu lieu quatre cents millions d'années après cet évènement de grande oxygénation a permis aux eucaryotes d'exploiter cette nouvelle niche écologique stressante et d'atteindre la diversité actuelle (Gross and Bhattacharya, 2010; Sperling et al., 2013). Le potentiel adaptatif des symbiotes mutualistes peut ainsi favoriser leur succès de transmission dans les populations d'hôte. Par exemple, la bactérie transmise verticalement *Spiroplasma*, qui empêche la stérilisation des mouches *Drosophila neotestacea* par des nématodes parasites, s'est répandue très rapidement dans les populations d'hôte grâce à la protection qu'elle apporte aux drosophiles contre ses ennemis naturels (Hamilton et al., 2016; Jaenike et al., 2010).

Les symbiotes peuvent donc être impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques de leurs hôtes et ainsi leur conférer un avantage sélectif. Dans un contexte de perturbation environnementale, les symbiotes peuvent être intégrés à la réponse adaptative des organismes, ce qui peut mener à l'établissement d'une relation symbiotique plus durable. Cependant la fréquence d'exposition et l'intensité de l'agent stressant sont des caractéristiques qui peuvent aussi influencer la stabilité de la relation entre partenaires symbiotiques. En effet, si les coûts métaboliques que les symbiotes imposent à l'hôte ne sont pas compensés par les bénéfices qu'ils prodiguent lors de contraintes environnementales peu fréquentes ou faiblement impactantes pour la valeur sélective de l'hôte, les symbiotes n'augmenteront pas en fréquence dans les

populations d'hôtes. Par exemple, la bactérie *Hamiltonella defensa*, transmise verticalement chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*, apporte aux pucerons une résistance contre les guêpes parasitoïdes *Aphidius ervi* (Hansen et al., 2012; Oliver et al., 2003; Vorburger et al., 2009). Dans une expérience réalisée sur des pucerons en cages à population, la fréquence des *A. pisum* infectés par *Hamiltonella* a augmenté considérablement après une exposition répétée au parasitisme par *A. ervi*. Dans les cages à population non exposées au parasitisme, un déclin significatif de la fréquence de *Hamiltonella* a aussi pu être identifié. Les résultats de cette expérience indiquent que la pression de sélection exercée par les ennemis naturels des hôtes peut conduire à l'augmentation en fréquence des symbiotes dans les populations d'insectes. La diminution en fréquence des pucerons infectés par *Hamiltonella* dans les cages à population en l'absence de parasitisme révèle un coût probable de l'infection, expliquant pourquoi *Hamiltonella* reste à des fréquences intermédiaires dans les populations naturelles (Oliver et al., 2008).

Bien que certains symbiotes apportent un avantage sélectif à leur hôte en condition stressante, s'ils sont acquis depuis l'environnement de manière horizontale, ils peuvent être expulsés dès le retour à l'état initial de l'hôte. Si l'hôte possède des mécanismes de choix ou de sanction du partenaire symbiotique et que le symbiote s'avère coûteux en absence de pression de sélection imposée par l'environnement stressant, les symbiotes ne sont plus en mesure de coloniser leur hôte, limitant ainsi la durabilité de l'interaction symbiotique et la coévolution des partenaires symbiotiques (Werner and Kiers, 2015). Dans certains cas, l'exposition à un nouvel agent stressant peut mener des hôtes à s'associer de façon transitoire à des symbiotes bénéfiques déjà présent dans l'environnement. Or, les coûts associés à la présence des symbiotes, leur disponibilité dans le milieu environnant ainsi que la fréquence et

l'intensité de l'exposition à l'agent stressant conditionneront l'évolution de la relation symbiotique.

Comment étudier la relation entre stress et symbiose ?

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la réponse des organismes exposés à des agents stressants. Comme évoqué précédemment, le mode de transmission, la biologie et les histoires de vie des organismes en interaction symbiotique et les paramètres constituant des agents stressants (nature, fréquence et intensité) sont des facteurs qui sont des déterminants majeurs de la réponse des organismes symbiotiques face aux perturbations environnementales. En effet, les agents stressants peuvent induire des transitions le long du continuum mutualisme-parasitisme en agissant sur les effectifs symbiotiques ou sur les fonctions des symbiotes. Par ailleurs, l'implication de la symbiose dans le potentiel adaptatif des organismes face à des changements environnementaux est importante et nécessite d'être étudiée. Mieux comprendre les mécanismes qui régissent les relations symbiotiques dans un contexte d'environnement changeant permettrait de mieux appréhender les impacts des changements globaux qui s'opèrent de nos jours et de potentiellement proposer de moyens pour en diminuer les effets.

Ce travail de thèse cherche à participer à cet effort de mise en évidence des impacts liés aux perturbations environnementales sur les associations symbiotiques, mais aussi d'étude des potentielles capacités d'adaptation de ces associations à un environnement changeant. Dans ce cadre, la stabilité et le caractère héritable des symbioses à transmission verticale permettent un suivi des caractéristiques symbiotiques au cours des générations d'hôtes. En particulier, l'étude des bactéries intracellulaires à transmission verticale *Wolbachia*, hébergées par la mouche du

vinaigre *Drosophila melanogaster*, permet une caractérisation des mécanismes de régulation de la population symbiotique et du potentiel adaptatif que confèrent ces symbiotes en condition de stress environnemental. En effet, *Wolbachia* est une bactérie très étudiée pour comprendre les facteurs qui influencent la régulation des interactions symbiotiques par son caractère héritable, et les phénotypes de manipulation de la reproduction qu'elle induit chez ses hôtes. Comme cette bactérie participe aussi à la protection de ses hôtes contre de nombreuses infections pathogènes et notamment contre des virus à ARN positif, elle est l'un des modèles les plus étudiés pour comprendre le rôle des symbiotes dans la réponse adaptative aux stress environnementaux biotiques. La capacité de cette bactérie à limiter la prolifération virale dans les tissus des insectes en fait également un moyen de lutte, contre les zoonoses vectorisées par les moustiques par exemple. Les souches de *Wolbachia* présentent des niveaux de protection variables, qui dépendent notamment de leur densité dans les tissus de leurs hôtes. La souche wMelPop est la souche qui présente les plus forts niveaux d'infection, et donc les plus forts coûts liés à la présence des symbiotes (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013; Min and Benzer, 1997; Ross et al., 2016). En effet, elle peut s'avérer coûteuse pour l'hôte en détournant la machinerie cellulaire et les ressources nutritives de son hôte. Cependant, comme la densité en *Wolbachia* est également corrélée à l'intensité de la protection antivirale apportée à l'hôte (Frentiu et al., 2010; Lu et al., 2012; Osborne et al., 2009, 2012), wMelPop prodigue une protection très efficace à ses hôtes en condition de stress viral. Cette souche est donc très avantageuse pour comprendre à la fois les mécanismes de régulation de la densité symbiotique et la protection contre les pathogènes, car les bénéfices et les coûts perçus par l'hôte sont exacerbés.

Ce travail de thèse a d'abord consisté à évaluer les déterminants de la régulation de la densité en *wMelPop* chez *Drosophila melanogaster*, en analysant les facteurs de régulation déterminés par l'hôte ou par les symbiotes et les potentielles forces évolutives en action dans l'établissement d'un optimum de densité symbiotique. Ensuite, il a été question de comprendre comment cet optimum de densité est sensible aux influences environnementales et aux agents stressant en cherchant, dans un premier temps, à caractériser la réponse directe de l'association symbiotique lors d'une exposition ponctuelle à des agents stressants pro-oxydant et viraux ou bien lors d'une exposition à la combinaison de ces deux agents stressants. Puis dans un second temps, l'étude de la réponse évolutive de cette association dans un contexte d'exposition répétée aux agents stressants sur plusieurs générations a permis d'étudier le potentiel adaptatif que procure cette bactérie à ses hôtes drosophiles et ainsi de comprendre comment évoluent l'hôte et la population bactérienne en condition de changements environnementaux à long terme. Afin de mieux appréhender ce travail de thèse, la suite de cette introduction portera sur la présentation des 2 agents stressants utilisés lors de ce travail, fréquemment rencontrés par les insectes, et qui sont susceptibles d'influencer les relations entre la drosophile et *Wolbachia*. Une présentation générale de *Wolbachia* et de son implication dans l'expression du phénotype de ses hôtes est tout d'abord nécessaire pour ensuite comprendre le rôle de cette bactérie dans la réponse aux agents stressants.

I.3. *Wolbachia* : un symbiote modèle approprié à l'étude des impacts des perturbations environnementales sur les associations symbiotiques.

Wolbachia pipientis

Wolbachia pipientis est une bactérie intracellulaire, transmise par la mère à ses descendants, appartenant à la classe des α -protéobactéries et à l'ordre des *Rickettsiales* (Werren, 1997; Werren et al., 2008). L'étude des génomes des différentes souches de *Wolbachia* a révélé une grande diversité génétique entre ces souches. Elles sont actuellement classées en 12 supergroupes (de A à L). Les supergroupes A et B sont les plus largement distribués chez les insectes (Ravikumar et al., 2010; Zhou et al., 1998). Depuis leur découverte chez le moustique *Culex pipiens* (Hertig and Wolbach, 1924), les *Wolbachia* ont été détectées chez d'autres espèces d'invertébrés, notamment des insectes, acariens, crustacés et des nématodes filaires (Hilgenboecker et al., 2008; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Werren, 1997; Werren et al., 2008; Zhou et al., 1998). *Wolbachia* est localisée dans les tissus somatiques et germinaux de l'hôte (Cheng and Aksoy, 1999; Cheng et al., 2000; Dobson et al., 1999; Frydman et al., 2006; Miller and Riegler, 2006; Min and Benzer, 1997; Moreira et al., 2009; Serbus and Sullivan, 2007; Walker et al., 2011) et réside dans des vésicules liées à l'appareil de Golgi associé aux microtubules ou au cortex cellulaire (Cho et al., 2011). *Wolbachia* possède une capacité métabolique limitée : elle ne conserve dans son génome que des voies incomplètes pour la synthèse de certaines vitamines et cofacteurs et ne dispose pas de certaines voies de biosynthèse pour la production d'acides aminés. Par conséquent, les *Wolbachia* dépendent fortement de leur hôte pour l'approvisionnement en acides aminés, vitamines et cofacteurs, ce qui les rend par ailleurs impossibles, jusqu'à présent, à cultiver *in vitro* (Foster et al., 2005; Wu et al., 2004). La distribution pandémique des *Wolbachia* chez

les arthropodes peut être attribuée à leur capacité à coloniser de nouvelles espèces par transmission horizontale et leur capacité à manipuler la reproduction de leur hôte (Figure I.3) (Kozek and Rao, 2007; Werren et al., 2008; Zug and Hammerstein, 2012). Les différentes souches de *Wolbachia* peuvent en effet induire différents phénotypes de manipulation de la reproduction chez la plupart des espèces d'arthropodes qu'elles infectent : la féminisation, la parthénogenèse thélytoque, le 'male-killing' ou l'incompatibilité cytoplasmique (IC).

Ces stratégies de manipulation de la reproduction expliquent comment *Wolbachia* peut envahir une population une fois qu'elle a réussi à infecter au moins un individu. Cependant, même des espèces hôtes étroitement apparentées ont souvent un statut d'infection différent (une espèce étant infectée mais pas l'autre) ou abritent des souches de *Wolbachia* très divergentes, ce qui suggère une forte instabilité des infections dans les lignées d'hôtes au cours de l'évolution (Bailly-Bechet et al., 2017). *Wolbachia*, en détournant les ressources de son hôte, peut s'avérer coûteuse, ce qui peut mener à son élimination de la population d'hôte. Bien que les coûts métaboliques associés à *Wolbachia* ne soient pas très répandus chez les insectes, la colonisation par certaines souches de *Wolbachia* peut réduire de moitié la longévité des hôtes (Brownstein et al., 2003; Cook et al., 2008; Min and Benzer, 1997; Moreira et al., 2009; Sinkins and O'Neill, 2000). Le maintien de *Wolbachia* dans des populations d'hôte peut alors être assuré par la compensation des coûts, *via* la manipulation de la reproduction qu'elle opère chez ses hôtes. Cependant, dès lors que les niveaux de manipulation de la reproduction sont faibles comme chez *Drosophila melanogaster* (Merçot and Charlat, 2004; Reynolds et al., 2003; Weeks et al., 2002), on s'attend à ce qu'elle

apporte un avantage sélectif à son hôte pour envahir et se maintenir chez ses hôtes (Brownlie and Johnson, 2009; Haine, 2008).

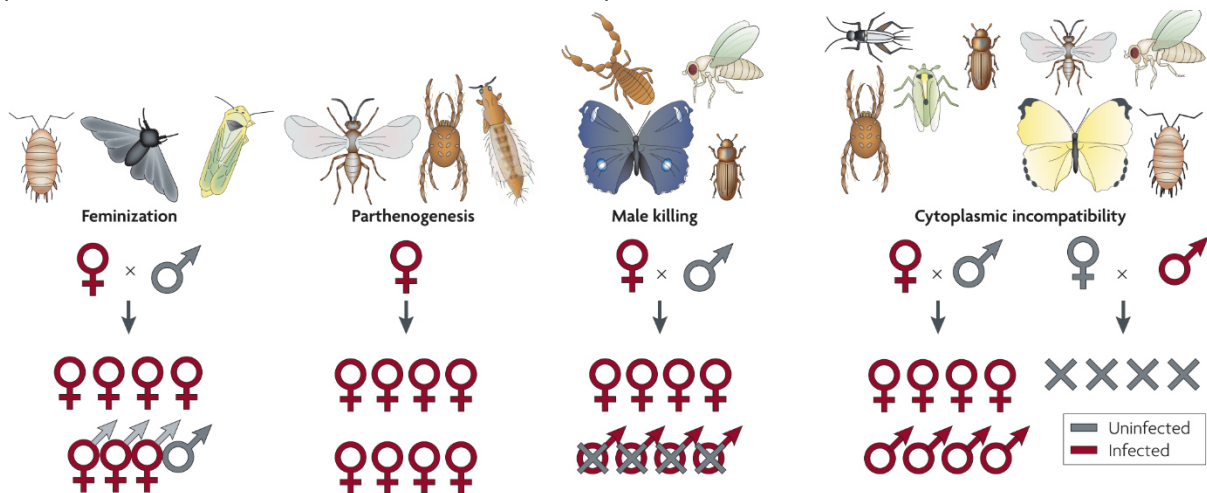


Figure I.3 | Les phénotypes induits par *Wolbachia*. *Wolbachia* provoque quatre phénotypes reproductifs distincts chez différents ordres d'arthropodes (en haut). La féminisation se traduit par des mâles génétiques qui se développent comme des femelles (chez certains Hémiptères, Isopodes et Lépidoptères). L'induction de la parthénogenèse élimine les mâles du processus de reproduction (chez certains Acariens, Hyménoptères et Thysanoptères). Le 'male-killing' élimine les mâles infectés au profit des femelles survivantes infectées (chez certains Coléoptères, Diptères, Lépidoptères et Pseudoscorpions). L'incompatibilité cytoplasmique empêche les mâles infectés de s'accoupler avec des femelles dépourvues des mêmes types de *Wolbachia* (chez certains Acariens, Coléoptères, Diptères, Hémiptères, Hyménoptères, Isopodes, Lépidoptères et Orthoptères). Figure et légende issus de la revue de Werren et consorts (2012).

***Wolbachia* une bactérie aussi mutualiste**

Le succès invasif de *Wolbachia* n'est pas toujours associé à la manipulation de la reproduction mais peut aussi être associé à l'apport de bénéfices. Par exemple, chez *Drosophila mauritiana*, les femelles colonisées par *Wolbachia* produisent jusqu'à 4 fois plus d'œufs que les femelles non colonisées. Il semblerait que chez cette espèce de drosophile, *Wolbachia* stimule l'activité mitotique de la lignée germinale de ses hôtes tout en réduisant l'activité apoptotique dans les ovaires (Fast et al., 2011). De plus, l'influence qu'exerce *Wolbachia* sur l'expression des gènes de ses hôtes pourrait améliorer leur longévité. Chez *Drosophila melanogaster*, la colonisation par *Wolbachia* influence l'expression du gène *chico* (Zheng et al., 2011), qui est impliqué dans la

régulation de la durée de vie de la drosophile (Clancy et al., 2001). Ces résultats pourraient indiquer une première base mécanistique des effets bénéfiques de *Wolbachia* sur la longévité des drosophiles (Fry and Rand, 2002; Fry et al., 2004; Maistrenko et al., 2015). L'aspect mutualiste des symbiotes se manifeste bien souvent de façon contexte-dépendante (Bronstein, 1994; Kiers et al., 2010), et c'est notamment le cas de la protection que *Wolbachia* confère à ses hôtes contre différents ennemis naturels. Chez les associations *Wolbachia*-insectes, certaines souches complètent le système immunitaire inné des hôtes par leur action de protection anti-pathogène. Des résistances, médiées par *Wolbachia*, à certaines infections virales, bactériennes ou à *Plasmodium* ont été caractérisées. Dans ces associations symbiotiques soumises à des agents stressants biotiques, *Wolbachia* est reconnue pour diminuer la charge en pathogènes et peut aussi retarder la mortalité induite par la présence des pathogènes (Andrews et al., 2012; Bian et al., 2010, 2013; Blagrove et al., 2013; Glaser and Meola, 2010; Hedges et al., 2008; Hughes et al., 2012; Jaenike et al., 2010; Moreira et al., 2009; Osborne et al., 2009; Teixeira et al., 2008; Zélé et al., 2012). Bien qu'ils ne soient pas ubiquitaires, les effets anti-pathogènes médiés par *Wolbachia*, décrits à la fois chez la drosophile et le moustique, peuvent participer à améliorer la valeur sélective de l'hôte. L'avantage sélectif que *Wolbachia* prodigue à certaines de ses espèces d'hôte peut alors contribuer à son succès de transmission.

Il existe aussi quelques cas extrêmes où *Wolbachia* est devenue indispensable pour ses hôtes : par exemple, chez la punaise de lit *Cimex lectularius*, où *Wolbachia* produit la vitamine B essentielle au développement des punaises et indispensable à leur survie (Nikoh et al., 2014), ou encore chez des espèces de nématodes filaires où *Wolbachia* fournit des composés essentiels à leur survie, tels que des acides aminés ou des nucléotides (ref).

La densité en *Wolbachia* détermine la balance coûts / bénéfiques

La transmission ainsi que les phénotypes induits par *Wolbachia*, qu'ils soient bénéfiques ou délétères, sont souvent liés à sa densité dans les tissus de ses hôtes. En effet, les coûts associés à *Wolbachia* dépendent aussi de sa densité dans les tissus de ses hôtes drosophiles : plus sa densité est importante, plus elle détourne la machinerie cellulaire et les ressources de l'hôte, et par conséquent, moins les hôtes sont longévifs (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013; Min and Benzer, 1997). Les densités en *Wolbachia* varient considérablement dans les différents types cellulaires et tissulaires de l'hôte qu'elle infecte (Cheng et al., 2000; Dobson et al., 1999; Osborne et al., 2012; Pietri et al., 2016). Il existerait donc chez l'hôte des mécanismes de régulation de la densité en *Wolbachia* dans ses tissus (McGraw et al., 2001; Veneti et al., 2004). En effet, au travers de leur immunité, les insectes peuvent réguler la densité en *Wolbachia* par l'activation de la voie Toll par exemple (Douglas et al., 2011; Lee et al., 2015b). Cependant, les différentes souches de *Wolbachia* qui infectent les insectes présentent des niveaux de densité variables (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2017). Ceci semble indiquer qu'il y a aussi des facteurs génétiques propres aux *Wolbachia* qui peuvent agir directement sur la régulation de la densité ou du moins interférer avec les mécanismes de régulation de l'hôte (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013; Mouton et al., 2003, 2004).

D'autre part, certaines études montrent que la densité en *Wolbachia* est corrélée à l'intensité de son activité anti-pathogène (Frentiu et al., 2010; Lu et al., 2012; Osborne et al., 2009, 2012). En effet, plus la quantité de *Wolbachia* est importante dans les tissus de l'hôte et plus la charge en pathogène est réduite. Dans le cas des infections virales chez la drosophile, cette diminution de la charge en pathogène s'accompagne d'une amélioration de la valeur sélective des hôtes (Hedges and

Johnson, 2008; Teixeira et al., 2008). Si l'hôte tire des bénéfices directs d'une forte densité en *Wolbachia*, on peut s'attendre à ce que la régulation qu'il exerce sur la densité bactérienne soit plus permissive. La densité symbiotique est aussi sensible aux influences environnementales qui peuvent jouer un rôle significatif dans la relation entre les partenaires. Par exemple, l'environnement abiotique, comme la température, peut fortement influencer la densité en *Wolbachia*. Une élévation de la température environnante chez les insectes infectés par *Wolbachia* peut se traduire par une augmentation de la densité dans les tissus de l'hôte (Mouton et al., 2006), en revanche, si cette élévation est trop importante, elle peut conduire à l'élimination de *Wolbachia* des tissus de l'hôte (Li et al., 2014; Ulrich et al., 2016). Ainsi, des paramètres environnementaux abiotiques comme la température peuvent-être déterminants dans le type de relation qu'entretient *Wolbachia* avec ses hôtes et pourraient influencer (positivement ou négativement) l'établissement d'un compromis adaptatif menant à un optimum de densité en *Wolbachia* (Mouton et al., 2006, 2007; Rohrscheib et al., 2016; Sumi et al., 2017).

Cependant, les mécanismes responsables de la régulation de la densité en *Wolbachia* chez les insectes restent assez mal décrits et nécessitent encore d'être caractérisés. Des premières pistes indiquent que la balance oxydative des hôtes pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'interaction entre *Wolbachia* et ses hôtes notamment sur sa densité. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) reconnues pour leur cytotoxicité peuvent endommager les cellules de l'hôte mais aussi avoir une activité microbicide *via* leur implication dans le système immunitaire des insectes. Par exemple, l'apport de molécules pro-oxydantes chez les insectes provoque une diminution de la densité, et à l'inverse, l'apport de molécules anti-oxydantes tend à augmenter la densité en *Wolbachia* (Monnin et al., 2016). Par

ailleurs la colonisation par *Wolbachia* peut aussi affecter les niveaux de ROS chez l'hôte, ce qui suggère que les ROS sont à la fois des acteurs essentiels du système immunitaire des insectes (Brennan et al., 2008a) et des agents perturbant directement l'homéostasie symbiotique. Par conséquent, la balance oxydative est une caractéristique qui influence les phénotypes induits par *Wolbachia*. Il est donc nécessaire d'explorer les rôles et conséquences des ROS sur les associations *Wolbachia*-insectes.

I.4. Le stress oxydatif dans les associations à *Wolbachia*

Les espèces réactives de l'oxygène et l'homéostasie oxydative

Au cours de la phosphorylation oxydative, les mitochondries des cellules eucaryotes produisent de façon directe et indirecte des molécules pro-oxydantes nommées espèces réactives de l'oxygène (Balaban et al., 2005). Ces espèces chimiques sont très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés, qui se stabilisent en 'arrachant' des électrons aux autres molécules. Le sous-produit direct de la chaîne respiratoire mitochondriale est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), qui par cascade de réaction est à l'origine de la création d'autres ROS (comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) lorsqu'il interagit avec les molécules d'eau présentes dans les cellules eucaryotes) (Valko et al., 2006). Les ROS peuvent aussi interagir avec les molécules du vivant et par conséquent provoquer des dommages sur les différents composés de la cellule eucaryote (ADN, protéines, lipides, etc.). Bien qu'ils soient considérés comme des sous-produits du métabolisme de la chaîne respiratoire, ils peuvent être impliqués dans l'immunité innée des eucaryotes lorsque leur toxicité est associée aux processus de phagocytose contre des pathogènes comme les bactéries et les levures (Ha et al., 2005b; Kim and Lee, 2014; Kohchi et al., 2009; Lee et al., 2015a, 2013; Nathan and Cunningham-Bussel, 2013; You et al., 2014). Les ROS jouent également un rôle important dans les cycles cellulaires en étant impliqués dans la division, la signalisation, la différenciation et l'apoptose des cellules (Dröge, 2002; Finkel, 2011; Kohchi et al., 2009; Ray et al., 2012; Valko et al., 2006).

L'ambivalence que présentent les ROS dans les cellules en fait une caractéristique cellulaire finement régulée. Leur production tout comme leur dégradation sont contrôlées par des processus enzymatiques qui visent à maintenir

un équilibre dans la cellule : l'homéostasie oxydative. La production mitochondriale de ROS peut être complétée de façon contrôlée par l'expression du gène DUOX (dual oxidase), une alternative qui conduit à la formation d' $O_2^{\cdot-}$ (Guichard et al., 2008). Leur dégradation est orchestrée par des voies enzymatiques qui produisent des protéines antioxydantes comme la superoxide dismutase (SOD), la catalase, les glutathiones peroxydases (Valko et al., 2006), et d'autres coenzymes à activité d'oxydo-réduction comme les cytochromes. La réactivité des ROS peut aussi être interrompue par des molécules capables de piéger et d'inactiver les radicaux libres. Ces molécules apportées par l'alimentation, essentiellement les vitamines (A, C, E), les caroténoïdes, les polyphénols dont les flavonoïdes et les tanins, donnent des électrons aux radicaux très réactifs pour en former de nouveaux moins réactifs qui seront recyclés. La perturbation de l'équilibre oxydatif de la cellule peut mener à une forte cytotoxicité et avoir un effet négatif sur la capacité de reproduction des organismes. La détoxification des ROS par les anti-oxydants est nécessaire pour maintenir la fertilité/fécondité, comme montré chez la drosophile (Parkes et al., 1998) et les moustiques (DeJong et al., 2007). Les dommages liés à la perturbation de l'équilibre oxydatif peuvent être limités par des mécanismes de réparation de l'ADN, des lipides, ou des protéines oxydées et permettre l'élimination, la réparation et le remplacement des molécules endommagées. L'implication dans de nombreuses fonctions physiologiques de la balance oxydative suppose qu'en cas de déstabilisation, le stress oxydatif pourrait impliquer des troubles physiologiques pour les organismes et opérer des transitions le long du continuum d'interaction symbiotique (Moné et al., 2014).

L'homéostasie oxydative est un paramètre déterminant de la régulation des interactions symbiotiques

L'homéostasie oxydative est donc un paramètre important dans l'expression du phénotype des individus. L'équilibre oxydatif est aussi un déterminant dans les relations symbiotiques et donc dans l'expression du phénotype étendu des individus. En effet, outre leurs effets délétères, les ROS sont aussi impliqués dans le dialogue interspécifique, notamment dans les relations symbiotiques (Moné et al., 2014). Les ROS, en étant impliqués dans les processus apoptotiques et dans d'autres cascades de signalisation (Ray et al., 2012; Schippers et al., 2012), peuvent affecter le développement des partenaires symbiotiques. Par exemple, les ROS agissent comme des molécules de signalisation, en activant les voies JAK-STAT et JNK, qui sont sollicitées dans la réponse immunitaire des insectes pour réguler la population symbiotique qui colonise leur intestin (Buchon et al., 2009). Le défi pour le système immunitaire de l'hôte consiste à trouver un équilibre entre la lutte contre les agents pathogènes et la tolérance des symbiotes bénéfiques (Sansonetti and Medzhitov, 2009). Par conséquent, une régulation étroite de la production de molécules effectrices immunitaires est nécessaire. Dans l'intestin de la drosophile, il existe deux grandes classes d'effecteurs immunitaires, les peptides antimicrobiens et les ROS (Kuraishi et al., 2013; Ryu et al., 2010). Il s'avère que la production de peptides antimicrobiens chez la drosophile ne constitue qu'une réponse complémentaire contre les pathogènes résistants aux ROS (Ryu et al., 2010; Woo et al., 2006). La production de ROS est dépendante de l'expression du gène DUOX dans l'intestin de la drosophile. Le domaine NADPH oxydase de DUOX synthétise du peroxyde d'hydrogène, converti ensuite en acide hypochloreux (HClO), qui est hautement microbicide (Ha et al., 2005b). Au niveau de l'intestin de la drosophile, l'uracile, qui est libérée seulement par

les bactéries pathogènes mais pas par les symbiotes commensaux (Lee et al., 2013), serait reconnue par des voies de signalisation qui déclenchent l'activation de l'expression de DUOX (Lee et al., 2015a). Cela permettrait à l'épithélium intestinal d'agir spécifiquement lorsque des pathogènes sont présents, préservant ainsi l'homéostasie immunitaire dans l'intestin de la drosophile (Kim and Lee, 2014; Lee et al., 2015a; You et al., 2014). Après l'augmentation de la production de ROS induite par des pathogènes, les niveaux de ROS sont activement réduits par l'activité de catalases, qui sont immuno-régulées pour éviter un stress oxydatif excessif (Ha et al., 2005a).

La balance oxydative des associations symbiotiques impliquant *Wolbachia*

En plus des agents stressants pro-oxydants abiotiques (e.g. température, molécules pro-oxydantes), les symbiotes peuvent aussi être une source de déséquilibre oxydatif lorsqu'ils induisent une surproduction de ROS chez leur hôte, en réponse à leur colonisation. C'est notamment le cas dans les symbioses impliquant *Wolbachia*, qui est susceptible de déclencher chez ses hôtes une réponse immunitaire mobilisant généralement la production de ROS (Andrews et al., 2012; Bian et al., 2013; Pan et al., 2012). En effet, la réponse immunitaire des insectes utilise souvent la balance oxydative dans ses mécanismes de défense (Nappi et al., 1995; Péan and Dionne, 2014). De manière générale, *Wolbachia* déclenche une réponse immunitaire dans des associations nouvellement formées (Zug and Hammerstein, 2015). Cependant, lorsque les associations hôte-*Wolbachia* ont coévolué, on observe très rarement une surproduction de ROS associée à la présence de *Wolbachia*. En effet chez le moustique *Aedes polynesiensis*, l'infection par la souche naturelle de *Wolbachia* ne provoque aucune altération de l'homéostasie oxydative, tandis qu'une

injection artificielle d'une autre souche de *Wolbachia* provoque une production accrue de ROS chez l'hôte (Andrews et al., 2012).

Les *Wolbachia* sont donc susceptibles d'être confrontées à un environnement cellulaire inhospitalier par la présence de ROS issus de l'hôte ou bien de l'environnement, ce qui expliquerait pourquoi on retrouve une conservation de certains gènes codant pour des protéines antioxydantes dans les génomes des *Wolbachia*, tels que la SOD ou la bacterioferritine (Brennan et al., 2008b; Kremer et al., 2009). Les coûts associés à la présence de *Wolbachia* chez les hôtes, notamment lors de multiplication excessive, semblent aussi être liés aux coûts imposés par la réponse immunitaire des hôtes lorsqu'ils produisent des ROS qui déstabilisent leur balance oxydative. Ainsi, la stratégie de production de molécules antioxydantes de la part de *Wolbachia* serait optimale pour réduire son impact négatif sur les traits d'histoire de vie de ses hôtes et par conséquent favoriser une fenêtre large pour sa transmission. Cette situation reflète aussi qu'il existe différents niveaux de régulation possibles entre les partenaires symbiotiques, qui révèlent un conflit entre ces derniers plus ou moins marqué en fonction de la relation qu'ils entretiennent (mutualiste ou parasitaire).

Un déséquilibre de l'homéostasie oxydative par l'apport exogène de molécules pro-oxydantes peut dépasser l'effet de compensation que *Wolbachia* peut générer par la production de protéines anti-oxydantes, renforçant ainsi les conflits entre les partenaires symbiotiques. Par exemple, l'apport de paraquat (un herbicide pro-oxydant chez les insectes) a pour conséquence de réduire drastiquement la densité en *Wolbachia* dans les tissus de certaines espèces de drosophiles (Monnin et al., 2016). Ainsi la perturbation de l'homéostasie oxydative s'inscrit bien dans le contexte de stress, comme acteur influant du phénotype étendu des organismes par son aptitude à modifier la balance entre les coûts et les bénéfices perçus par l'hôte.

I.5. Le stress viral dans les associations à *Wolbachia*

La protection antivirale médiée par *Wolbachia*

La protection antivirale médiée par *Wolbachia* a été découverte chez *D. melanogaster* en 2008 (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Dans ces deux études, les mouches infectées par *Wolbachia* étaient protégées contre certaines infections virales comparées à des mouches contrôles ayant subi un traitement antibactérien visant à éliminer *Wolbachia*. En effet, en présence de *Wolbachia*, les drosophiles présentent un retard significatif de la mortalité induite par des virus pathogènes à ARN positif tels que le virus C de la Drosophile (*Dicistroviridae*, DCV), le virus de la paralysie du criquet (*Dicistroviridae*, CrPV) et le 'Flock house virus' (*Nodaviridae*, FHV) (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Dans le cas du DCV, une diminution de la charge virale en début d'infection est associée au retard de mortalité des hôtes drosophiles, tandis que pour le FHV, le retard de mortalité n'est pas associé à une diminution de la charge virale. Pour le Noravirus, un virus non pathogène, une diminution de la prolifération virale en présence de *Wolbachia* a aussi été observée (Teixeira et al., 2008).

La protection antivirale médiée par *Wolbachia* a également été bien caractérisée chez *D. simulans*, une espèce sœur de *D. melanogaster*. Les souches *wAu* et *wRi* protègent efficacement leur hôte *D. simulans* contre la mortalité induite par le virus lors d'une infection systémique par le DCV et le FHV (Osborne et al., 2009). La souche *wAu* confère une protection antivirale plus efficace que *wRi* chez sa population hôte native en bloquant la réplication du virus, contrairement à *wRi*. L'interaction entre le génotype des hôtes et celui des souches de *Wolbachia* pourrait alors avoir un impact sur la protection antivirale médiée par *Wolbachia* (Teixeira et al., 2008). Comme les souches de *Wolbachia* chez *D. simulans* sont connues pour être

associées à différents haplotypes mitochondriaux (William and Ballard, 2000), il est plausible que les différents génotypes et cytotypes d'hôtes possèdent une sensibilité différente à l'infection virale. De manière intéressante, il a été démontré que certaines souches de *Wolbachia* ne sont pas capables de conférer une protection antivirale efficace chez *D. simulans*. Les souches *wNo* et *wHa* ne retardent pas la mortalité induite par le virus, et ne limitent pas l'accumulation de particules virales chez leur hôte natif respectif (Osborne et al., 2009). Il semblerait que les souches de *Wolbachia* qui assurent une protection antivirale soient phylogénétiquement proches de *wMel*. Les souches *wAu* et *wRi* appartiennent au supergroupe A comme la souche *wMel*, tandis que la souche non protectrice *wNo* appartient au supergroupe B. La souche *wHa* qui est aussi non protectrice appartient bien au supergroupe A, mais semblerait être la souche la plus éloignée phylogénétiquement de *wMel* (Casiraghi et al., 2005; Zhou et al., 1998). Il existe une certaine disparité dans l'efficacité de la protection contre les virus FHV et DCV conférée par différentes souches de *Wolbachia* colonisant des drosophiles. Par une approche comparative, Martinez *et al.* ont pu mettre en évidence que ces différences d'efficacité de protection observées entre les souches semblent étroitement liées à des facteurs génétiques propres à chacune de ces souches (Martinez et al., 2014).

Sur l'ensemble des modèles précédemment évoqués, nous avons pu identifier que la présence de *Wolbachia* peut avoir deux impacts différents sur les infections virales : 1) le blocage de la réplication virale, observé lorsque la charge virale diminue par rapport à des individus aposymbiotiques ; 2) la protection antivirale, observée lorsque la survie après infection virale (ou tout autre proxy de la valeur sélective des hôtes) est moins réduite que chez les individus aposymbiotiques. Étant donné que l'efficacité de la protection antivirale conférée par *Wolbachia* s'explique à la fois par

des facteurs propres aux hôtes et aux symbiotes, il est possible que les caractéristiques impliquées dans les effets antiviraux médiés par *Wolbachia* soient reliées à ces facteurs. La densité en *Wolbachia*, qui est aussi une caractéristique déterminée en partie par des facteurs génétiques extrinsèques (hôtes) et intrinsèques (bactériens), est probablement un acteur important dans la réponse de l'association aux infections virales.

La densité en *Wolbachia* est un facteur clé des effets antiviraux

L'abondance relative en *Wolbachia* dans les tissus de ses hôtes, notamment drosophiles, s'avère importante quant à l'établissement de la protection antivirale et au blocage de la réplication virale (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013; Frentiu et al., 2010; Lu et al., 2012; Martinez et al., 2014, 2015; Moreira et al., 2009; Osborne et al., 2009, 2012). Les différentes associations *Wolbachia*-drosophile présentent aussi une distribution des symbiotes différente dans les tissus de l'hôte. De plus, lors d'une infection virale, la protection est plus efficace chez les associations qui présentent une densité symbiotique plus importante (Dobson et al., 1999; Dutton and Sinkins, 2004; Miller and Riegler, 2006; Osborne et al., 2009, 2012). Chez *D. melanogaster*, les variants qui assurent une meilleure protection contre l'infection virale présentent des densités plus élevées par rapport aux variants qui ont montré une protection antivirale plus faible (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2014). Chez *D. simulans*, les niveaux de densité en *Wolbachia* des souches protectrices sont plus élevés que ceux des souches non protectrices (Osborne et al., 2009). De plus, la capacité de protection antivirale médiée par *Wolbachia* semblerait se perdre lorsque la densité d'une souche pourtant protectrice est diminuée artificiellement (Osborne et al., 2012). Enfin, chez les moustiques, la densité en *Wolbachia* est aussi importante

pour le blocage de la réplication virale *in vivo* et *in vitro* (Bian et al., 2013; Frentiu et al., 2010; Lu et al., 2012; Moreira et al., 2009).

Étant donné que la densité en *Wolbachia* est associée à l'intensité de la protection antivirale et que les souches de *Wolbachia* non protectrices se retrouvent à faible densité (Osborne et al., 2009), on pourrait supposer : 1) que le caractère protecteur d'une souche de *Wolbachia* pourrait être réversible en modifiant les niveaux de densité d'une souche protectrice (une diminution artificielle de la densité qui mènerait à l'inactivation de la protection) ou non protectrice (une augmentation artificielle de la densité qui mènerait à l'induction de la protection) ; et 2) que les mécanismes moléculaires qui confèrent le blocage de la réplication et la protection antivirale seraient quantitatifs et dépendants de la production de l'ensemble de la population bactérienne peuplant les tissus de l'hôte.

Utilisation de *Wolbachia* dans la lutte antivectorielle

En plus de mieux comprendre les déterminants de la régulation des interactions symbiotiques et le potentiel adaptatif des symbiotes dans un contexte de changements globalisés, l'étude des effets antiviraux médiées par *Wolbachia* a aussi un grand intérêt sanitaire. En effet, l'étude de la protection antivirale a pour une de ses finalités la lutte contre les virus vectorisés par les arthropodes. D'après l'OMS, les maladies à transmission vectorielle représentent plus de 17 % de l'ensemble des maladies infectieuses et causent plus de 700 000 décès par an. Elles peuvent être causées par des parasites, des bactéries ou des virus transmis par tout type de vecteur animal incluant les insectes. La dengue est l'infection virale la plus répandue, transmise par les moustiques. Plus de 3,9 milliards de personnes dans plus de 129 pays risquent de contracter la dengue, avec environ 96 millions de cas symptomatiques et 40 000 décès

chaque année. Le potentiel antiviral de *Wolbachia* a donc suscité de nombreuses études, qui ont eu pour but de trouver des moyens de lutte contre la propagation de maladies virales vectorisées par les moustiques. Pour ce faire, les souches wMel et wMelPop, provenant de la drosophile, ont été transinfectées avec succès et de manière stable chez plusieurs espèces de moustiques des genres *Aedes* et *Anopheles*, qui étaient pour la plupart naturellement non-infectés par *Wolbachia* (Bian et al., 2010; Blagrove et al., 2012; Jin et al., 2009; Moreira et al., 2009). Ces études ont montré que la combinaison des propriétés d'interférence antivirale de *Wolbachia* et de ses capacités d'envahissement des populations par incompatibilité cytoplasmique constitue une manière efficace de lutter contre la propagation de ces maladies virales (Hoffmann et al., 2011, 2014; Walker et al., 2011). Ces études, dans le cadre de la lutte antivectorielle, ont aussi l'avantage de décrire les impacts phénotypiques de *Wolbachia* chez les arthropodes dans un contexte viral mais procurent aussi des premières pistes de compréhension des mécanismes sous-jacents aux effets antiviraux médiés par cette bactérie. Bien qu'au niveau phénotypique, à la fois chez les moustiques et chez les drosophiles, les conséquences de la présence de *Wolbachia* dans un contexte viral soient assez bien décrites, la description des mécanismes moléculaires qui sont responsables du blocage de la réplication virale et de la protection antivirale manque encore de clarté.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement des effets antiviraux de *Wolbachia*.

Les effets antiviraux conférés par *Wolbachia* apparaissent dans différentes associations *Wolbachia*-insecte infectées par des virus à ARN. Cela suggère la possibilité d'un mécanisme sous-jacent commun qui pourrait cibler des aspects du cycle de vie des virus à ARN. L'ensemble des hypothèses émises qui tentent de

décrire les mécanismes moléculaires produisant les effets antiviraux repose sur le fait que *Wolbachia* déstabilise l'environnement cellulaire des hôtes, nécessaire à la réplication des virus à ARN. En effet, *Wolbachia* modifie l'environnement cellulaire de ses hôtes à la fois sur des aspects de morphologie intracellulaire (Ferree et al., 2005; Newton et al., 2015; Revealed et al., 2017; Sheehan et al., 2016) et de métabolisme cellulaire (Caragata et al., 2013; Geoghegan et al., 2017; Molloy et al., 2016) et influence potentiellement l'expression des gènes de ses hôtes notamment sur la réponse immunitaire (Hughes et al., 2012; Kremer et al., 2012; Xi et al., 2008; Zheng et al., 2011), la production de petits ARN (Hussain et al., 2011; Mayoral et al., 2014; Osei-Amo et al., 2012), le métabolisme (Kremer et al., 2009; Zheng et al., 2011) ou encore dans la production de protéines antioxydantes (Brennan et al., 2008b; Kremer et al., 2012).

Une première hypothèse suggère que la présence de *Wolbachia* stimulerait le système immunitaire basal de l'hôte, ce qui aurait pour conséquence de protéger l'hôte contre d'autres pathogènes (Wong et al., 2011). Cependant, l'ensemble des études qui démontrent de tels effets anti-pathogènes a été réalisé sur des associations artificielles *Wolbachia*-moustique (Bian et al., 2010; Kambris et al., 2009, 2010; Moreira et al., 2009; Ye et al., 2013), tandis que chez les associations naturelles *Wolbachia*-drosophile, il n'existe aucune preuve concrète de stimulation immunitaire produisant un effet anti-pathogène (Rances et al., 2013; Rancès et al., 2012; Wong et al., 2011). Ce mécanisme est toujours en débat dans ce champ de recherche car les effets anti-pathogène liés au *priming* immunitaire dépendent des caractéristiques génétiques des souches et des hôtes étudiés (Kambris et al., 2009; Rottschaefer and Lazzaro, 2012; Wong et al., 2011; Ye et al., 2013).

Une seconde tentative d'explication des mécanismes moléculaires produisant les effets antiviraux concerne les ROS. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que la perturbation de l'équilibre oxydatif cellulaire des insectes par *Wolbachia* peut réduire la prolifération de la Dengue chez *Ae. aegypti* (Bian et al., 2010; Pan et al., 2012) et *Ae. polynesiensis* (Andrews et al., 2012; Bian et al., 2013) ou encore du DCV, FHV et CrPv chez *D. simulans* (Brennan et al., 2008b; Osborne et al., 2009; Wong et al., 2015, 2016). Chez le moustique, la présence de *Wolbachia* conduirait à une cascade de réactions menant à l'inhibition de la réplication du virus de la dengue. *Wolbachia* induirait la production de ROS (comme le peroxyde d'hydrogène), qui mèneraient à l'activation de la voie immunitaire Toll, produisant à son tour des peptides antimicrobiens (défensines et cecropines) inhibant la prolifération des particules virales de la dengue dans les cellules (Pan et al., 2012). Chez la drosophile, la voie Toll n'est pas nécessaire pour la protection antivirale médiée par *Wolbachia* (Ferreira et al., 2014a; Rances et al., 2013) et les gènes AMP impliqués dans les voies Toll et/ou Imd ne sont pas activés par la présence de *Wolbachia* (Chrostek et al., 2014; Ferreira et al., 2014a; Martinez et al., 2014; Rances et al., 2013; Rancès et al., 2012; Wong et al., 2011). Cependant, les routes d'infections des virus semblent jouer aussi un rôle important dans la réponse immunitaire : une infection aux mêmes virus de façon systémique (piqûre intrathoracique) semble induire une réponse immunitaire différente d'une infection locale par transmission orale (Mondotte and Saleh, 2018).

Les petits ARN pourraient aussi jouer un rôle dans les effets antiviraux médiées par *Wolbachia*. La voie des petits ARN interférents (siARN) est une des réponses antivirales des plus importantes chez les insectes et joue un rôle prépondérant dans les réponses immunitaires de la drosophile (Galiana-Arnoux et al., 2006; Ghildiyal and Zamore, 2009; Van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006) et du moustique (Blair, 2011).

Cependant, la voie des siARN n'est pas sollicitée lors de la protection antivirale ou le blocage de la réplication médiée par *Wolbachia* chez la drosophile ou le moustique (Brackney et al., 2010; Caragata et al., 2021; Glaser and Meola, 2010; Hedges et al., 2012; Scott et al., 2010). Une seconde voie impliquant les petits ARN serait quant à elle plus susceptible d'avoir un impact sur les réponses antivirales médiées par *Wolbachia* chez les moustiques. En effet, la voie des micro-ARN (miARN) joue un rôle important dans les interactions *Wolbachia*-moustique et semble influencer indirectement l'infection virale (Hussain et al., 2011; Osei-Amo et al., 2012; Zhang et al., 2013). Cependant, aucune étude ne rapporte une quelconque implication de cette voie chez les associations *Wolbachia*-drosophile (Monsanto-Hearne and Johnson, 2018). Cela suggèrerait que l'activation immunitaire n'est pas essentielle au mécanisme de protection, ou bien qu'il existerait une activation dépendante de l'hôte.

D'autres travaux de recherche suggèrent que les effets antiviraux médiés par *Wolbachia* chez les insectes résulteraient d'une compétition pour les ressources cellulaires entre *Wolbachia*, les particules virales et les cellules hôtes (Caragata et al., 2013; Frentiu et al., 2010; Geoghegan et al., 2017; Molloy et al., 2016; Moreira et al., 2009; Osborne et al., 2009; Rainey et al., 2014; Schultz et al., 2017). Dans ce modèle, qui tente d'expliquer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets antiviraux, le cholestérol et certains acides aminés seraient des ressources limitantes que se disputeraient les différents protagonistes (Lindsey et al., 2018). Le cholestérol est un lipide clé, impliqué à la fois dans la stabilité de la membrane cellulaire et la signalisation cellulaire, qui sont toutes deux nécessaires à l'entrée et à la réplication des particules virales dans les cellules de l'hôte (Frentiu, 2017). Ni les insectes ni *Wolbachia* ne possèdent des voies de biosynthèse du cholestérol, et ils sont donc dépendants des apports en cholestérol contenus dans l'alimentation de l'insecte. Chez la drosophile,

une augmentation de l'apport en cholestérol alimentaire conduit à une diminution de la protection antivirale et du blocage de la réplication virale médiée par *Wolbachia* (Caragata et al., 2013). Chez le moustique, on constate aussi une augmentation de la réplication du virus Zika lorsque que le milieu est supplémenté en cholestérol (Schultz et al., 2017), mais cette observation n'a pas été faite directement sur la réplication du virus de la dengue. Il semblerait que *Wolbachia* détourne le cholestérol en l'estérifiant, empêchant ainsi aux virus de l'exploiter sous cette forme. En dé-estérifiant le cholestérol, le virus de la dengue recouvrerait sa faculté à se répliquer correctement dans des cellules de moustiques infectées par *Wolbachia* (Geoghegan et al., 2017). Dans ces études, l'augmentation de l'apport en cholestérol alimentaire ou bien sa mise à disposition limite la compétition pour les ressources entre *Wolbachia* et les virus et permettrait ainsi aux virus de recouvrer leur potentiel de réplication et de pathogénicité, en dépit de la présence de *Wolbachia*.

L'ensemble de ces hypothèses présente des pistes pour élucider l'origine moléculaire des effets antiviraux. L'effet antiviral de chacun de ces mécanismes étant limité et/ou spécifique, il est très probable que plusieurs des mécanismes décrits précédemment soient à l'œuvre lors de la réponse antivirale médiée par *Wolbachia*. La combinaison des différents mécanismes pourrait aussi être dépendante des interactions génotype (hôte) - génotype (bactérien) - génotype (viral), ce qui pourrait aussi expliquer la difficulté à généraliser les mécanismes moléculaires à l'œuvre.

Les effets antiviraux médiés par *Wolbachia* contre le Virus C de la drosophile.

Dans cette partie, nous nous intéressons plus particulièrement au DCV et à la protection induite par *Wolbachia* chez ses hôtes drosophiles. Ce virus est le seul virus naturel de la drosophile pour lequel une protection et un blocage de la réplication virale

médiés par *Wolbachia* sont décrits, ce qui en fait un cas particulièrement intéressant pour l'étude de l'influence de *Wolbachia* en condition naturelle d'infection virale.

Le virus C de la drosophile est largement répandu chez les drosophiles (Gomariz-Zilber et al., 1995; Huszar and Imler, 2008a), on estime que 30 à 40% des populations naturelles et de laboratoires sont infectées par le DCV (Brun et al., 1980; Johnson and Christian, 1998; Plus et al., 1975), bien que cette prévalence ait été remise en question récemment (Webster et al., 2015). Le DCV, qui appartient à la famille des *Dicistroviridae*, est très bien caractérisé : c'est un virus à ARN positif non enveloppé et à simple brin. Son génome de 1 kb est lié à une protéine virale (VP)-g à son extrémité 5' et polyadénylé à son extrémité 3' et contient deux cadres ouverts de lectures (ORFs) (Jousset et al., 1977; King and Moore, 1988). L'ORF 1, située vers l'extrémité 5', code pour une polyprotéine non structurale de 202 kDa essentielle à la réplication virale contenant une hélicase, une protéase et une ARN-polymérase ARN dépendante. L'ORF 2, située vers l'extrémité 3', code pour une polyprotéine structurale de 100 kDa qui comprend les 4 protéines constituant la capsid virale (VP1-4). Une fois que le DCV est internalisé par les cellules de la drosophile par endocytose *via* le manteau de clathrine (Cherry and Perrimon, 2004), la structure cellulaire de l'hôte est modifiée, facilitant ainsi le transport, la réplication et l'emballage des particules virales (Cherry et al., 2005, 2006).

Ses effets phénotypiques et physiologiques sont aussi très bien caractérisés : ce virus est pathogène pour ses hôtes drosophiles, leur longévité et leur fécondité étant affectées (Brun et al., 1980; Christian and Scotti, 1998; Plus et al., 1975). Les drosophiles qui sont naturellement infectées par le DCV peuvent mourir dans les 6 jours suivant leur infection (Gomariz-Zilber et al., 1995). Le DCV présente un tropisme particulier pour les tissus du tractus digestif de ses hôtes (Chtarbanova et al., 2014).

Lors d'une infection systémique, il se loge préférentiellement dans les muscles viscéraux entourant l'intestin moyen des drosophiles (*i.e.*, l'ensemble d'organes situés entre l'œsophage et le côlon, allant du proventricule à la jonction des tubules de Malpighi) et dans les muscles entourant les lobes du jabot (*i.e.*, l'organe de stockage de la nourriture relié à l'œsophage). L'infection des muscles du tractus digestif mène à l'obstruction de l'intestin des drosophiles, empêchant la transformation et l'assimilation correcte de l'alimentation. Lors de l'infection au DCV, la taille de l'abdomen des drosophiles infectées augmente et la production de fèces est aussi largement réduite. La mort prématurée des drosophiles serait donc provoquée par des effets de malnutrition liés à une déficience en triglycérides et en glycogène (Chtarbanova et al., 2014; Peller et al., 2009; Sansone and Blumenthal, 2012).

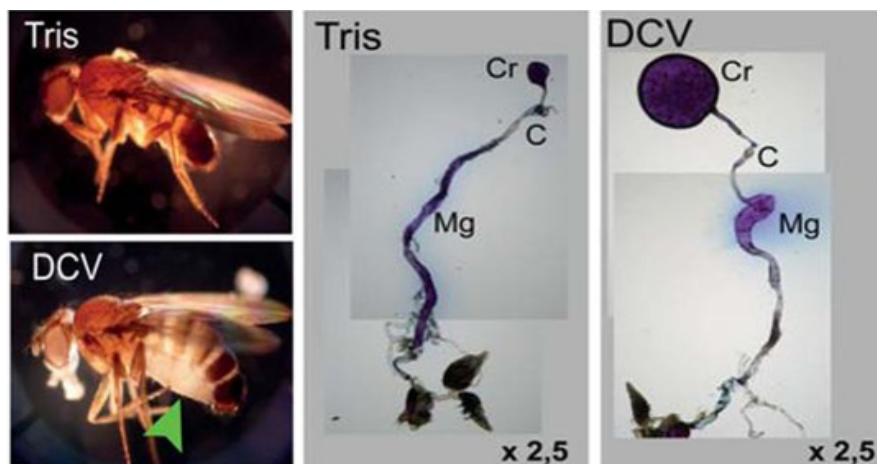


Figure 1.4 | Le DCV déclenche une obstruction intestinale. Le gonflement abdominal caractéristique observé chez les mouches infectées par le DCV est indiqué par la pointe de la flèche verte. L'obstruction intestinale est causée par une augmentation de la taille du jabot visible sur la dissection de l'appareil digestif des drosophiles (identifié par Cr). Figure et légende issues de Chtarbanova et consorts (2014).

Les populations naturelles de *D. melanogaster* présentent une susceptibilité variable à l'infection au DCV. Une base génétique explique 47% de cette susceptibilité au sein des populations de *Drosophila melanogaster*: certains allèles des gènes *pastrel* et *Ubc-E2H* confèrent une résistance ciblée contre le DCV (Cogni et al., 2016;

Magwire et al., 2012; Martins et al., 2014) et peuvent envahir les populations quand une pression de sélection constante est maintenue sur plusieurs générations (Faria et al., 2018; Martinez et al., 2016). Cependant, les mécanismes de la résistance conférée par ces allèles restent assez mal décrits, bien qu'on pourrait supposer qu'ils soient impliqués dans les réponses immunitaires sollicitées par le DCV. La voie immunitaire majeure qui est employée par les drosophiles pour lutter contre le DCV est l'ARN interférence (ARNi). Le DCV étant capable de supprimer l'activité principale d'ARNi chez ses hôtes en inhibant la production de siARN par Dicer, l'ARNi s'opère par le biais de miARNs qui sollicitent les protéines Ago-2 et RISC, afin de dégrader les ARNs viraux (Ding and Voinnet, 2007; Kemp and Imler, 2009; Meister and Tuschl, 2004; Van Rij et al., 2006; Tolia and Joshua-Tor, 2007). Certains gènes de la voie immunitaire JAK/STAT semblent aussi être activés en présence de DCV, mais cette activation ne suffit pas à déclencher la réponse antivirale (Dostert et al., 2005; Hedges et al., 2008). La réponse antivirale dépendrait plus du lien entre la voie JAK/STAT et la voie d'ARNi via la protéine Vago, qui agirait en tant que cytokine (Kingsolver and Hardy, 2012; Kingsolver et al., 2013; Myllymäki and Rämetsä, 2014; Paradkar et al., 2012; Souza-Neto et al., 2009).

Bien que des mécanismes de résistance innée existent chez *D. melanogaster*, ils ne sont pas ubiquitaires et ne sont pas sélectionnés dans les populations infectées par *Wolbachia* (Martinez et al., 2016; Martins et al., 2014). En effet, lorsque des drosophiles infectées par *Wolbachia* sont exposées sur plusieurs générations au DCV, les allèles « résistants » du gène *pastrel* sont moins représentés que chez des drosophiles n'étant pas infectées par *Wolbachia*. Dans ce cas, *Wolbachia* représente un frein à l'évolution de ses hôtes en ralentissant leur adaptation aux conditions virales par le biais des allèles du gène *pastrel*. Les allèles du gène *pastrel* et *Wolbachia* ont

tous deux des effets substantiels sur la résistance au DCV. Cependant, *Wolbachia* protège contre un plus large éventail de virus à ARN (Cogni et al., 2021; Glaser and Meola, 2010; Martinez et al., 2014; Moreira et al., 2009; Teixeira et al., 2008), alors que les gènes *pastrel* et d'autres polymorphismes génétiques chez *D. melanogaster* sont beaucoup plus spécifiques (Magwire et al., 2012; Martins et al., 2014). Cela pourrait favoriser le symbiote défensif par rapport aux mécanismes de défenses propres aux hôtes, surtout si la résistance hôte à certains virus est moins efficace et/ou moins généraliste. Comme évoqué précédemment, *Wolbachia* protège ses hôtes en retardant à la fois la mortalité induite par le DCV et l'accumulation des particules virales. Comme les tropismes tissulaires du DCV et de *Wolbachia* varient, nous pouvons supposer que le niveau de blocage du virus dépendrait de la répartition de *Wolbachia* dans les tissus de l'hôte, ce qui pourrait expliquer pourquoi les souches de symbiotes diffèrent dans leurs effets antiviraux (Caragata et al., 2013; Kaur et al., 2020). Cependant, aucune preuve n'indique une meilleure protection lorsque *Wolbachia* est plus représentée dans les tissus infectés par le DCV. En effet, l'abondance relative en *Wolbachia* dans chacun des tissus de l'hôte ne semblent pas être corrélée avec la réduction du titre viral (Kaur et al., 2020). Il n'empêche que toutes les souches de *Wolbachia* ne protègent pas aussi efficacement contre les infections virales au DCV et que la caractéristique qui les différencie le plus est la densité globale dans les tissus de l'hôte (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2017). Il est donc nécessaire de comprendre ce lien entre densité et effets antiviraux pour tenter de décrire à la fois les mécanismes impliqués dans les effets antiviraux et l'évolution des associations symbiotiques en condition de stress viral.

I.6. Description du modèle et objectifs de la thèse

Description du modèle biologique :

Dans le cadre de l'étude des déterminants du phénotype étendu, l'emploi de *Drosophila melanogaster* est avantageux sur plusieurs aspects liés à sa biologie. D'une part, cette espèce de diptère présente des cycles de vie assez courts permettant une évolution rapide des hôtes et de la population symbiotique en condition de stress. D'autre part, *D. melanogaster* est l'hôte naturel de nombreuses souches de *Wolbachia* et *wMelPop* a notamment été découverte chez des lignées de laboratoire de *D. melanogaster*. De plus, cette espèce est la cible du virus C de la drosophile contre qui *wMelPop* apporte une protection très efficace. Pour finir, cette espèce modèle est très bien caractérisée pour sa biologie, sa génétique et son immunité, ce qui facilite l'étude des différents déterminants de la régulation symbiotique et de la réponse au stress à plusieurs échelles (phénotype et analyses « -omiques »).

La souche *wMelPop* est aussi très avantageuse pour comprendre les relations hôte-symbiote et les différents déterminants qui peuvent agir sur l'expression du phénotype des individus. En effet, parmi les différentes souches de *Wolbachia*, *wMelPop* présente une balance bénéfices/coûts exacerbée, qui dépend des conditions environnementales. *wMelPop* est la souche de *Wolbachia* qui protège le plus efficacement ses hôtes contre les infections virales systémiques (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2014). Contrairement aux autres souches de *Wolbachia*, elle prolifère rapidement dans les tissus des insectes et peut atteindre des niveaux de densité bien supérieurs à l'ensemble des autres souches. Par ailleurs, ces niveaux de densité corrént avec l'intensité de la protection qu'elle confère aux drosophiles contre certaines infections virales. Or, en l'absence de stress viral, les niveaux de densité

corrèlent aussi avec les coûts qu'elle impose à ses hôtes. En effet, cette souche a été initialement identifiée au cours d'une étude de lignées de laboratoire de *Drosophila melanogaster* à la recherche de mutations génétiques provoquant une dégénérescence cérébrale (Min and Benzer, 1997). Min et Benzer (1997) ont démontré que le phénotype de réduction de la durée de vie des drosophiles était en réalité causé par la prolifération excessive de cette souche particulière de *Wolbachia*. Min et Benzer ont d'ailleurs baptisé la souche "popcorn", en raison de son aspect en conglomérat dans les cellules cérébrales infectées (Figure I.5). Cette souche a alors été identifiée comme virulente pour les insectes, chez qui elle provoque des dommages cellulaires et peut réduire de moitié la durée de vie à de fortes températures (au-delà de 29°C) (McGraw et al., 2002; McMeniman et al., 2008, 2009; Reynolds et al., 2003). Cependant, tout comme les autres souches de *Wolbachia*, l'expression des coûts induits par cette souche wMelPop est hautement dépendante de la température d'élevage des hôtes. A hautes températures (au-delà de 29 °C), cette souche présente des coûts supérieurs aux autres souches, ces coûts étant vraisemblablement liés à une plus forte densité à ces fortes températures. Dans des conditions moins défavorables pour les hôtes, cette souche de *Wolbachia* est particulièrement avantageuse pour étudier les conséquences des coûts imputables à la présence des symbiotes et aux potentielles interactions avec les contraintes environnementales capables de déstabiliser l'équilibre de la régulation symbiotique. Actuellement, nous ne disposons ni de capacité à cultiver *Wolbachia* à l'extérieur des cellules de ses hôtes ni de moyens efficaces de transformation génétique, ce qui limite considérablement les approches de génétique fonctionnelle permettant d'étudier les bases génétiques des divers effets des souches de *Wolbachia* sur leurs hôtes. Malgré ces limites, wMelPop s'avère être un bon candidat pour étudier la relation entre génotype et

phénotype chez *Wolbachia* car les fortes densités que présente cette souche semblent liées à une particularité génétique intrinsèque.

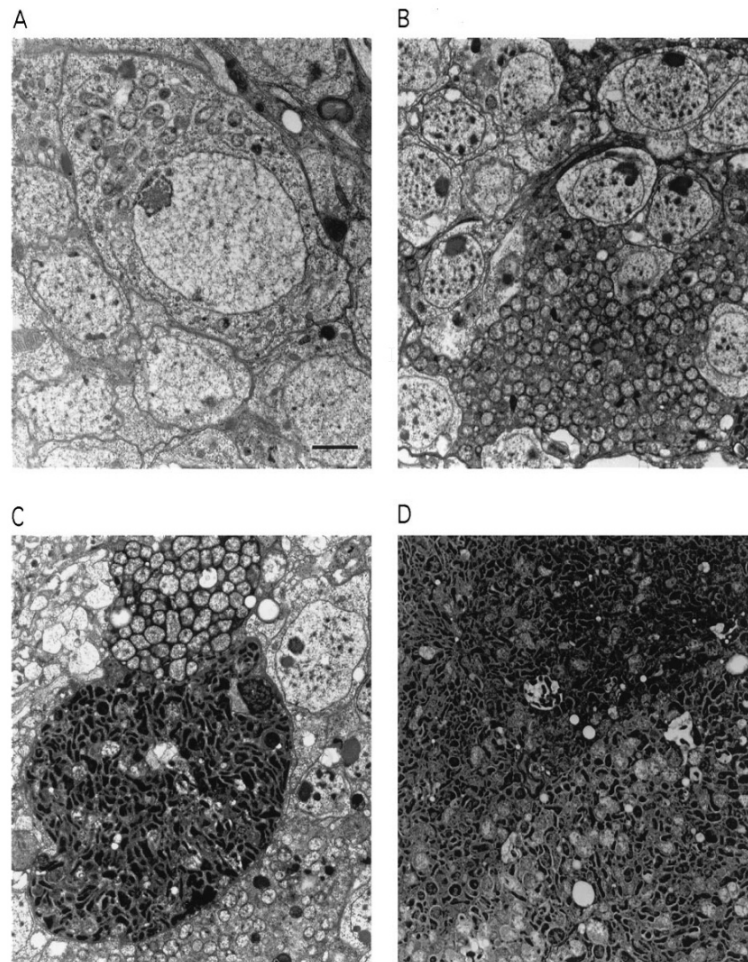


Figure 1.5 | Prolifération de la souche *Wolbachia* popcorn dans le cerveau de la drosophile adulte. (A) Drosophile âgée d'un jour porteuse de *wMelPop*. Notez les bactéries dans le cytoplasme d'une cellule neuronale du cortex cérébral. (B) Chez une drosophile âgée de 8 jours, on observe une prolifération extrême de la bactérie. (C) Fusion de deux cellules cérébrales infectées. Dans l'une des cellules, les bactéries ont pris une forme allongée et dense, ressemblant à des endospores. (D) Dans une mouche encore plus âgée (11 jours), la forme dense prédomine. (échelle = 2 μ m). Figure et légendes issues de Min et Benzer (1997).

Plusieurs études de génomique comparative ont pu identifier que la souche *wMelPop* est très proche génétiquement des souches *wMel* et *wMelCS* (Chrostek et al., 2013; Paraskevopoulos et al., 2006; Sun et al., 2001; Woolfit et al., 2013), les souches colonisant le plus couramment *D. melanogaster*. Elle aurait dérivé très récemment de *wMelCS* dans des lignées de drosophile de laboratoire (Woolfit et al., 2013). Le lieu et la date d'acquisition de la lignée de drosophile porteuse de *wMelPop*

ne sont pas bien définis, mais son identification par Min et Benzer provient d'une lignée de drosophiles ayant été collectée avant 1948 en Chine (Hannah, 1949; Valencia and Muller, 1949). Les dates de collecte déduites de wMelPop et l'extrême similitude génomique avec la souche wMelCS suggèrent que la souche pathogène wMelPop ait dérivé de wMelCS au milieu du 20^{ème} siècle. Il est possible que les mutations qui ont rendu wMelPop pathogène se soient produites dans la nature avant la collecte de la lignée portant cette souche. Cependant, comme les coûts associés à la présence de wMelPop sont élevés, il semble plus probable que l'évolution de la virulence se soit produite en laboratoire après la collecte d'une lignée portant une souche wMelCS. Bien que la lignée de *D. melanogaster* portant la souche à l'origine de wMelPop ait été croisée avec des mâles irradiés d'autres lignées (Hannah, 1949; Valencia and Muller, 1949), rien ne prouve que les femelles de cette lignée aient été directement exposées à des agents mutagènes. En l'absence d'héritage paternel de *Wolbachia*, les mutations qui ont conduit au développement de la virulence sont susceptibles d'être le résultat d'erreurs normales dans la réplication génomique, et d'avoir été maintenues grâce à une faible pression de sélection pour la longévité lors de l'élevage des lignées de drosophiles infectés (Woolfit et al., 2013).

L'apparente similitude génétique entre wMelPop et les souches wMelCS et wMel est surprenante car contrairement à wMelPop, ces dernières sont peu coûteuses pour leurs hôtes. De plus, la souche wMelCS/Canton-S (de laquelle dériverait wMelPop) serait plus proche génétiquement de wMelPop que d'autres souches de wMelCS. Ainsi, ce n'est pas sur le contenu des gènes que se base la différence phénotypique et la virulence de cette souche. Des premières pistes ont supposé que ces différences reposent sur des bases épigénétiques. En effet, les génomes de nombreuses souches de *Wolbachia* sont connus pour coder deux adénine méthylases

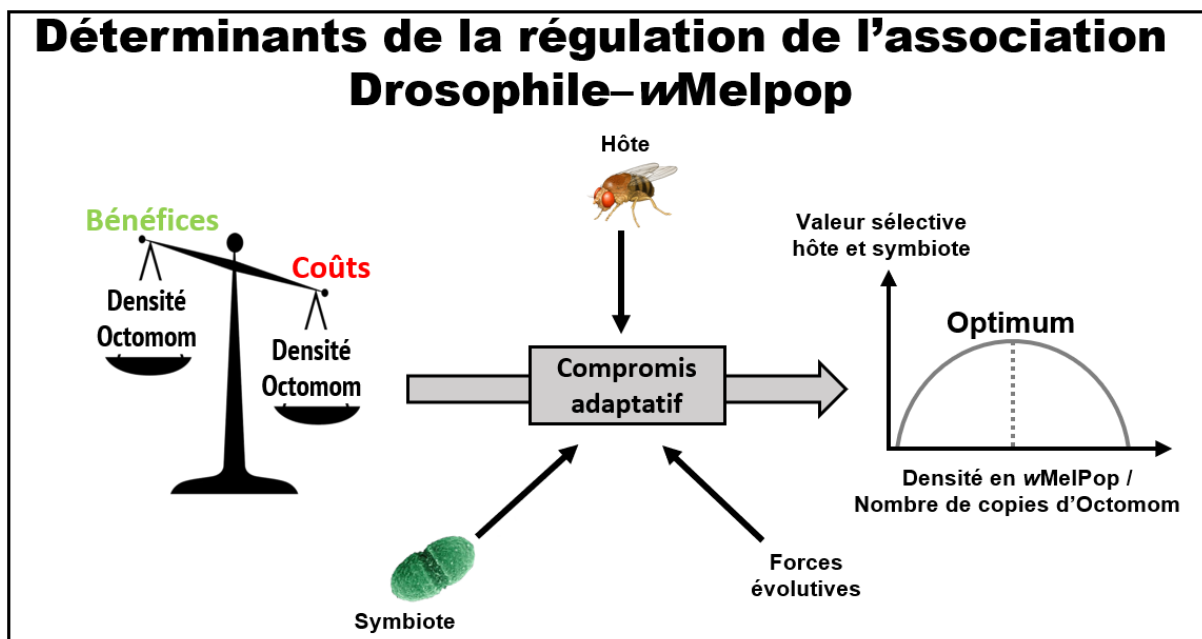
dérivées de phages (Saridaki et al., 2011), et des homologues de ces gènes sont présents chez *wMel*, *wMelCS* et *wMelPop*, ce qui suggère que ces souches possèdent la machinerie génétique nécessaire pour méthyle de manière différentielle leurs génomes. Cependant, l'origine de la prolifération excessive de *wMelPop* repose sur une particularité génétique et non épigénétique. Deux études parues la même année (2013) ont pu identifier qu'une région génomique de 20 kb était soit en plusieurs copies chez la souche *wMelPop* soit complètement absente du génome des souches de *wMelPop* qui colonisent *Drosophila melanogaster* (Chrostek et al., 2013) ou ayant été transinfectées durablement chez les moustiques (*wMelPop-CLA* et *wMelPop-PGYP*) (Woolfit et al., 2013). L'amplification de cette région génomique chez la souche infectant les drosophiles a ensuite été mise en lien avec sa virulence. L'amplification de cette région appelé Octomom dans le génome des bactéries corrèle parfaitement avec la densité relative en *wMelPop* dans les tissus des drosophiles. Ainsi, Chrostek et consorts (2015) ont pu mettre en évidence que la mortalité des drosophiles infectées par *wMelPop* dépendait du nombre moyen de copies d'Octomom dans la population bactérienne présente dans leurs tissus. Cette région, comprenant des gènes dont les fonctions restent à caractériser plus finement, est flanquée par des motifs répétés d'origine rétrovirale qui pourraient être à la source de la duplication de cette région dans le génome des bactéries. Ainsi, différents variants de *wMelPop* portant une quantité variable de copies de cette région (jusqu'à 15 copies en moyenne) pourraient cohabiter au sein d'un seul et même hôte. En plus d'avoir mis en évidence une relation entre le nombre de copies d'Octomom et les coûts sur la valeur sélective des hôtes, Chrostek et consorts (2013 et 2015) ont aussi pu mettre en évidence que l'intensité de la protection antivirale chez *D. melanogaster* corrèle avec le nombre de copies d'Octomom moyen de la population bactérienne au sein de l'hôte.

I.7 Objectifs de la thèse :

Un des avantages majeurs de ce modèle d'étude est qu'il permet une certaine traçabilité de l'évolution de la population bactérienne sur un marqueur génétique héritable (Octomom) ayant des implications phénotypiques à la fois chez les symbiotes (densité) mais aussi chez les hôtes (coûts et protection). Ce modèle permet alors d'approfondir un ensemble de questions inhérentes à l'étude des relations hôte-symbiotes, notamment sur les facteurs impliqués dans la régulation de la densité symbiotique, comme la contribution relative de chacun des partenaires symbiotiques à cette régulation ou encore l'influence des forces évolutives telles que la sélection et la dérive dans le compromis adaptatif qui s'opère au niveau de la densité symbiotique. L'héritabilité d'Octomom est aussi très avantageuse pour évaluer la réponse adaptative de l'association *via* la densité aux variations environnementales ponctuelles ou chroniques.

Au cours de ce projet de thèse, la symbiose entre *Drosophila melanogaster* et *wMelPop* a donc été employée dans un premier temps pour comprendre les déterminants de la régulation des associations symbiotiques. Dans un second temps, le projet de thèse a consisté à déterminer l'influence des perturbations environnementales sur l'association symbiotique. Afin de caractériser les changements physiologiques et phénotypiques en réponse aux agents stressants et l'influence de *wMelPop* dans cette réponse, l'association symbiotique a alors été exposée à un agent stressant pro-oxydant et au virus C de la drosophile de façon ponctuelle. Enfin, par une approche d'évolution expérimentale sur 12 à 24 générations d'hôte, l'association a été soumise à ces mêmes agents stressants de façon chronique, pour mettre en lumière les influences respectives des processus évolutifs dans le retour ou non à l'optimum de densité symbiotique.

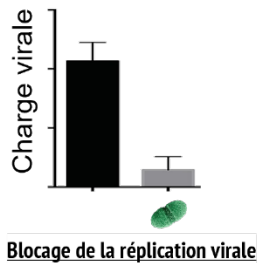
Le premier chapitre de cette thèse apporte une description de l'association *wMelPop-D. melanogaster* sans perturbation environnementale et met en évidence les influences de chacun des partenaires symbiotiques et des forces évolutives en jeu (comme la dérive) dans l'établissement du phénotype de l'association symbiotique. La synthèse d'expériences visant à manipuler différents fonds génétiques hôtes et bactériens sera exposée dans cette partie, afin de mieux comprendre les différents déterminismes en jeu dans cette association symbiotique.



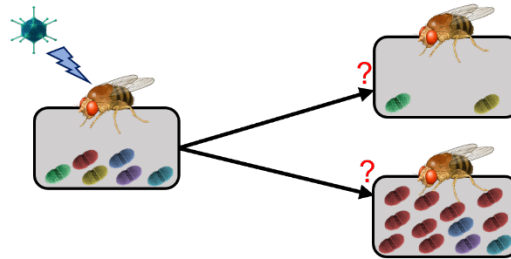
Le second chapitre de cette thèse s'intéresse aux conséquences des perturbations environnementales sur l'association *wMelPop-D. melanogaster* et notamment l'influence d'un agent stressant viral. Les réponses de l'association à une exposition ponctuelle puis chronique seront caractérisées par le biais d'une expérience d'évolution en condition d'exposition au DCV.

Impacts des expositions ponctuelles et chroniques au DCV sur l'association symbiotique

Effets antiviraux médiés par *Wolbachia* en réponse à une exposition ponctuelle au DCV

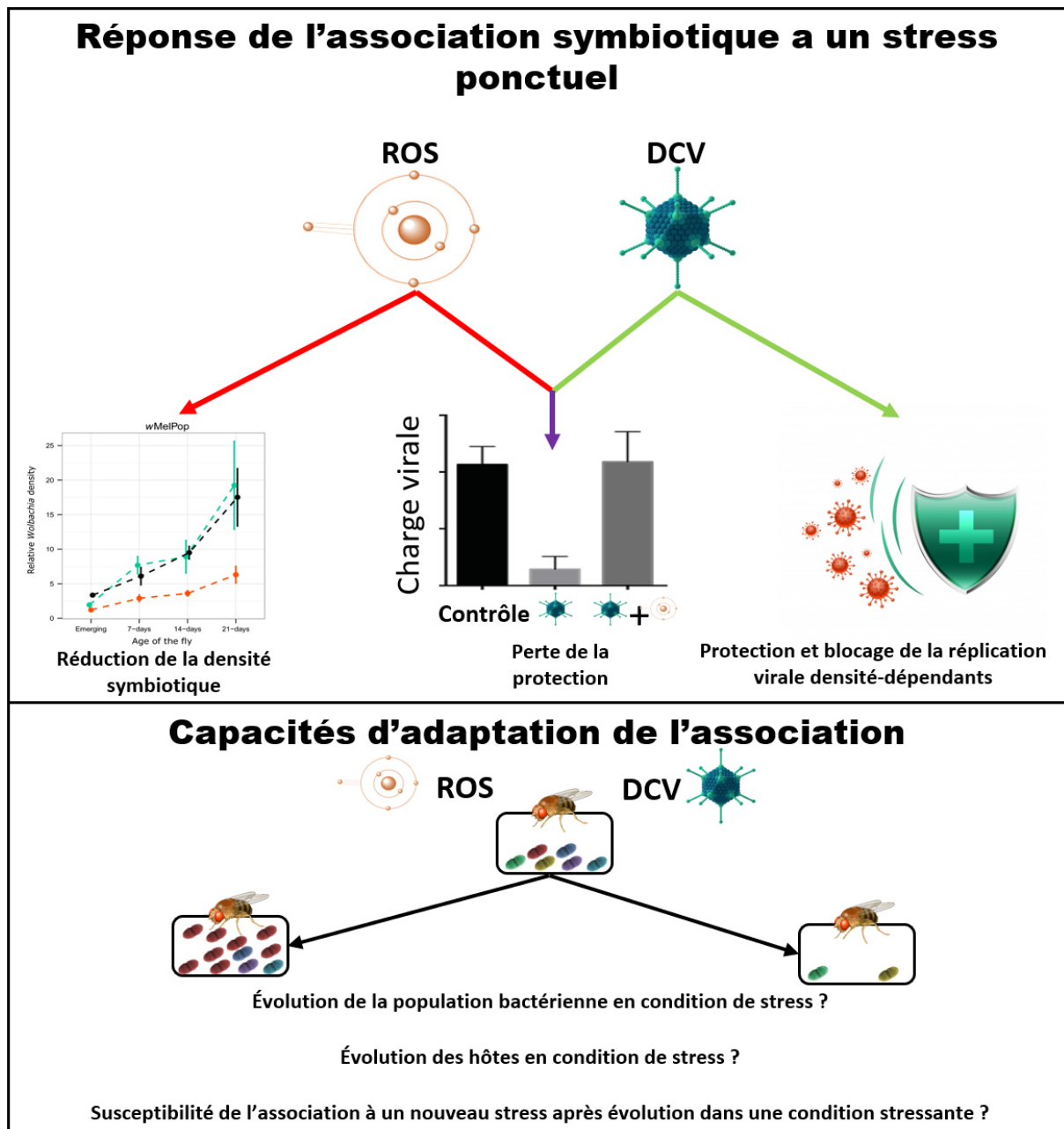


Evolution de la population symbiotique en condition d'exposition chronique au DCV



Enfin, nous aborderons dans le troisième chapitre de cette thèse les conséquences du stress oxydatif sur l'association symbiotique et sur les effets antiviraux de *wMelPop*. Tout comme pour l'influence de l'agent stressant viral, une synthèse des réponses de l'association à une exposition ponctuelle puis chronique à un agent pro-oxydant sera décrite. Ce chapitre abordera aussi la question de la combinaison des agents stressants pour comprendre les conséquences d'une exposition multiple aux agents stressants sur les associations symbiotiques. Pour finir, ce dernier chapitre permettra de comprendre comment une évolution dans une

condition stressante peu influencer la réponse de l'association dans un nouveau contexte stressant.



***II. Identification des déterminants de la
régulation de la densité symbiotique dans
l'association wMelPop-Drosophile***

II.1. Introduction

Dans le but d'identifier les facteurs qui influencent les relations hôtes-symbiotes, nous avons étudié les mécanismes de régulation de la densité symbiotique dans le modèle de symbiose entre *D. melanogaster* et *wMelPop*. Ce projet, initié lors de mon stage de M2, a été poursuivi au cours de ma thèse. Au cours d'expériences préliminaires, nous avons estimé la densité en *wMelPop* et le nombre de copies d'*Octomom* chez des populations d'origines géographiques très diverses de *D. melanogaster* dans lesquelles *wMelPop* avait été introgressée. L'objectif était de vérifier le statut de colonisation par *wMelPop* de ces populations et de me familiariser avec les techniques de biologie moléculaire employées lors de ma thèse. Les résultats de cette expérience préliminaire ont montré des patrons de colonisation relativement contrastés entre les populations colonisées par *wMelPop* : les différentes populations présentaient une gamme étendue de densité symbiotique et de nombre de copies d'*Octomom*. Etant donné que ces populations d'hôtes étaient issues de plusieurs populations naturelles provenant de différentes localités, chacune possédant un fond génétique différent, nous avons émis l'hypothèse que l'hôte pouvait influencer la sélection des différents variants bactériens et que les mécanismes sous-jacents pouvaient résulter d'adaptations locales pour des optimums différents de densité en *Wolbachia*.

L'avantage de ce modèle d'étude est qu'il permet d'identifier assez aisément les influences respectives de chacun des partenaires symbiotiques. D'une part, l'emploi de drosophiles permet une manipulation rapide et facile des fonds génétiques des hôtes et des symbiotes via des rétrocroisements. Et d'autre part, le nombre de copies d'*Octomom* de la souche *wMelPop* est un caractère génétique bactérien

facilement mesurable. Ainsi l'utilisation de ce modèle d'interaction permet : (i) de caractériser la contribution relative des partenaires dans la régulation de la densité symbiotique, (ii) de mesurer l'influence des processus évolutifs comme la sélection et la dérive dans la transmission des différents variants de *wMelPop* et leurs implications dans le compromis qui agit sur la régulation de la densité symbiotique.

D'un point de vue pratique, nous avons utilisé deux approches complémentaires pour tester l'influence potentielle de l'hôte sur la densité symbiotique. Une première expérience a eu pour but de reproduire les introgressions (technique permettant de coloniser une lignée d'hôtes aposymbiotiques par croisement avec une lignée porteuse de symbiotes) à partir de la même lignée donneuse utilisée initialement, afin d'évaluer si nous retrouvions les mêmes patrons de colonisation que nous avons mis en évidence dans notre analyse préliminaire. Dans la seconde expérience, nous avons réalisé des croisements réciproques entre des lignées présentant de forts niveaux de densités en *wMelPop* avec des lignées en présentant de plus faibles, afin d'« échanger » le fond génétique des hôtes et donc les mécanismes de régulation des symbiotes.

A l'issue de ces expériences de M2, nous avons identifié un fort effet de transmission maternelle, qui ne permettait pas de conclure sur le potentiel rôle des hôtes dans la sélection des différents variants de *wMelPop*. Nous avons donc entrepris de réitérer les mesures de traits bactériens après plusieurs générations, sur chacune des lignées issues de ces deux expériences pour tester l'influence des forces évolutives comme la sélection et la dérive sur la transmission des variants bactériens. L'ensemble des résultats qui complètent cette étude initiale sont présentés dans l'article 1, intitulé « *Wolbachia load variation in Drosophila is more likely caused by drift than by host genetic factors* ». Cet article est disponible en libre accès, a été examiné

par des pairs (Alison Duncan, Michael Hochberg, Simon Fellous, et un expert anonyme), recommandé par *Peer Community in Evolutionary Biology* (voir annexe VI.1), et publié dans *Peer Community Journal*. Ma contribution à cet article a été à la fois dans la conception et la réalisation des expérimentations, dans les analyses statistiques. J'ai été aidé techniquement dans ce travail par Hélène Henri, pour la mise en place des techniques de quantification des symbiotes. Enfin, j'ai participé à la rédaction des différentes parties de l'article et édité les figurés.

II.2. Article 1 : *Wolbachia* load variation in *Drosophila* is more likely caused by drift than by host genetic factors



Peer Community Journal

Section: Evolutionary Biology

RESEARCH ARTICLE

Published
2021-11-29

Cite as

Alexis Bénard, Hélène Henri,
Camille Noûs, Fabrice Vavre and
Natacha Kremer (2021)
*Wolbachia load variation in
Drosophila is more likely caused
by drift than by host genetic
factors*, Peer Community
Journal, 1: e38.

Correspondence

alexis.benard@outlook.com
natacha.kremer@normalesup.org

Peer-review

Peer reviewed and
recommended by
PCI Evolutionary Biology,
[https://doi.org/10.24072/pci.
evobiol.100126](https://doi.org/10.24072/pci.evobiol.100126)



This article is licensed
under the Creative Commons
Attribution 4.0 License.

Wolbachia load variation in *Drosophila* is more likely caused by drift than by host genetic factors

Alexis Bénard¹, Hélène Henri¹, Camille Noûs²,
Fabrice Vavre¹, and Natacha Kremer¹

Volume 1 (2021), article e38

<https://doi.org/10.24072/pcjournal.50>

Abstract

Symbiosis is a continuum of long-term interactions ranging from mutualism to parasitism, according to the balance between costs and benefits for the protagonists. The density of endosymbionts is, in both cases, a key factor that determines both the transmission of symbionts and the host extended phenotype, and is thus tightly regulated within hosts. However, the evolutionary and molecular mechanisms underlying bacterial density regulation are currently poorly understood. In this context, the symbiosis between the fruit fly and its intracellular bacteria *Wolbachia* (wMelPop strain) is particularly interesting to study. Although vertically transmitted, the symbiont is pathogenic, and a positive correlation between virulence and wMelPop density is observed. In addition, the number of repeats of a bacterial genomic region -Octomom- is positively correlated with *Wolbachia* density, underlying a potential genetic mechanism that controls bacterial density. Interestingly, the number of repeats varies between host individuals, but most likely also within them. Such genetic heterogeneity within the host could promote conflicts between bacteria themselves and with the host, notably by increasing within-host competition between symbiont genotypes through a process analogous to the tragedy of the commons. To characterize the determinisms at play in the regulation of bacterial density, we first introgressed wMelPop in different genetic backgrounds of *D. melanogaster*, and found different density levels and Octomom copy numbers in each host lineage. To determine whether such variations reflect a host genetic determinism on density regulation through Octomom copy number selection, we replicated the introgressions and performed reciprocal crosses on the two *Drosophila* populations with the most extreme density levels. In both experiments, we detected an absence of directionality in the patterns of infection, associated with a strong instability of these patterns across generations. Given that bacterial density was highly correlated with Octomom copy numbers in all experiments, these results rather suggest a strong influence of drift and a random increase in the frequency of certain bacterial variants. We then discuss how drift, both on the symbiont population during transmission and on the host population, could limit the efficiency of selection in such a symbiotic system, and the consequences of drift on the regulation of density and composition of bacterial populations.

¹Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgroSup, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558, Villeurbanne, France, ²Laboratoire Cogitamus, France

Introduction

A majority of organisms live in symbiosis, a close relationship between two organisms belonging to different species that ranges along the continuum between parasitism and mutualism (De Bary 1879; Tipton *et al.* 2019). In the case of microorganisms, the regulation of the symbiont population within the host, and particularly their abundance within host tissues, are important characteristics that shape the tight relationship between partners and influence the position of the symbiosis along the mutualism-parasitism continuum (Tiivel 1991; Douglas 1994). Research on disease evolution has further shown that the evolution of virulence is balanced by the transmission of symbionts to new hosts, and that both virulence and transmission rely on the regulation of the symbiotic density (Anderson & May 1982). On the one side, an increased virulence can benefit symbionts by increasing their instantaneous transmission, as they exploit more host resources and thus increase their replication within the host. On the other side, the more abundant the symbionts are in host tissues, the more they cost to the host, which shortens the host life span and thereby the window of transmission of the symbiont. As a result, the virulence/transmission trade-off leads to a reproduction rate optimum that optimizes symbiont transmission over the entire life of the host. More specifically in vertically transmitted symbioses, the optimum symbiotic density optimizes both the production of offspring and their colonization by symbionts.

Symbiont density is thus under strong regulation (O'Neill *et al.* 1997; Alizon *et al.* 2009), and many factors can contribute to its control (López-Madrugal & Duarte 2019). In insects for instance, host factors can play a major role in regulating the symbiont population (Poinsot *et al.* 1998; Douglas 2014) through the activation of immune pathways, such as DUOX or Toll (Douglas *et al.* 2011; You *et al.* 2014). Symbionts can also be involved in their own regulation according to particular genetic factors (Ijichi *et al.* 2002; Chrostek *et al.* 2013). This is for example the case in symbioses between wasps and vertically transmitted bacteria, where densities of *Wolbachia* are strain-specific in co-infection (Mouton *et al.* 2003, 2004). Still, some mechanisms involved in bacterial regulation are poorly understood in insects. For instance, the target of bacterial regulation remains to be clarified: does the host control the overall symbiont population by decreasing symbiont abundance regardless the symbiont genetic specificity or does it target specific variants? Also, control mechanisms that are independent of classical immune pathways are worth exploring. For instance, are cases where hosts sanction symbiont through differential allocation of metabolites frequent and widespread in symbiotic associations (Douglas 2008)?

There is much evidence to suggest that selection should lead to symbiotic population control systems (Douglas 2014), but two evolutionary mechanisms could limit the effectiveness of selection on density regulation and should also be taken into consideration: conflicts between different levels of selection and drift. In terms of selection levels, between-host selection predicts that any excessive replication would be detrimental to host fitness, thus selecting for symbiotic variants that are the least harmful while being well transmitted (Szathmáry & Smith 1995). On the contrary, the competition that occurs within the host tissues should favor symbiont variants that are the most efficient to rapidly colonize the host, thus those that have the most proliferative abilities regardless of the cost paid by the host (Alizon *et al.* 2013). This raises the question of whether within- and between-host selection create an evolutionary conflict regarding the control of symbiont density, by favoring symbiont strains with opposite replication profiles (O'Neill *et al.* 1997; Monnin *et al.* 2020). Finally, the importance of drift in vertically transmitted symbioses could be more considered. Indeed, bottlenecks during transmission reduce the genetic diversity in the following host generation and may limit the effectiveness of selection upon symbiotic population regulation (Mathé-Hubert *et al.* 2019). Such molecular and evolutionary mechanisms remain poorly studied, especially in vertically transmitted symbioses, although they can play an important role in the epidemiological and evolutionary dynamics of symbiotic interactions. A first limitation is conceptual, as populations of vertically transmitted endosymbionts tend to be considered with little or no heterogeneity, thus limiting the potential for within-host selection. However, while recurrent bottlenecks during transmission tend to reduce diversity, heterogeneity can still be observed in certain systems (Banks & Birky 1985; Birky *et al.* 1989; Abbot & Moran 2002; Asnicar *et al.* 2017). A second -more practical- limitation is that if heterogeneity does exist in symbiont populations, it is difficult to trace it experimentally, because of the absence of genetic markers.

A good study model to address questions related to density control is the maternally transmitted bacterium *Wolbachia* in association with *Drosophila melanogaster* hosts. In particular, the virulent wMelPop strain (Min & Benzer 1997), which can exhibit heterogeneous density levels between individuals, has differential virulence profiles. Virulence is notably correlated to a tandem amplification of the genomic region “Octomom” (Chrostek *et al.* 2013). Indeed, flies harboring *Wolbachia* with more copies of Octomom exhibit high density levels in their tissues and a reduced lifespan, while those harboring *Wolbachia* with fewer copies exhibit low density levels and survive longer (Chrostek & Teixeira 2015). This model system is therefore advantageous because hosts and symbionts can exhibit genetic variability, and because the number of Octomom copies can be used as a marker to track the evolution of the symbiotic population. Moreover, previous studies showed that within-host selection can occur in the wMelPop in *D. melanogaster* (Chrostek & Teixeira 2018; Monnin *et al.* 2020).

In this study, we take advantage of this *Drosophila*-wMelPop symbiosis to shed light on the evolutionary determinisms that act on the regulation of vertically transmitted symbionts in insects. We investigate whether the host genetic background can directly influence the density of the symbionts, or whether the symbionts self-regulate their density *via* Octomom. Using different host genetic backgrounds and a combination of introgressions and crossing experiments, we analyze the respective role of host and symbiont backgrounds, but also drift, in the evolution of density and genetic composition of the symbiotic population.

Methods

Model system

Drosophila melanogaster flies were trapped in different locations (Arabia, Bolivia, China (Canton), Republic of the Congo - RC (Brazzaville), USA (Seattle) (Vieira *et al.* 1999) and France (Sainte-Foy-lès-Lyon)). These populations have been maintained in the laboratory by regular sib mating for at least 10 years and are considered as genetically homogeneous. In the following experiments, we used these 6 inbred lines (*Wolbachia*-free) plus the w1118 line, infected either by the *Wolbachia* strain wMelPop (provided by Scott O’Neill (Monash University, Australia)) or by the strain wMelCS (provided by J. Martinez/F. Jiggins, Cambridge University, UK).

Rearing and collection

Flies were maintained under 12-hour day/night cycles at constant temperature and hygrometry (25°C and 60% relative humidity) and reared on rich medium (for 1 L of medium: 73.3 g of Gaude flour, 76.7 g of inactive brewer's yeast, 8.89 g of agar-agar powder, 4 g of Tegosept - Nipagine, 0.4 L of distilled water and 55.5 mL of 95% ethanol). With the exception of introgression experiments (see below), each new generation was established by tube transfer of approximately 80 randomly selected 4/5-day old individuals, to ensure full fertility of the flies. To control larval competition prior to sampling for infection patterns, we pooled about 80 flies in egg-laying cages and transferred 100 eggs laid by 4/5-day old females onto a rich medium pellet (1 mL) placed in a tube of agarose medium. After hatching, flies were transferred onto an agarose medium supplemented with sugar (10 %) and were collected after 7 days to be frozen and stored at -20°C.

Wolbachia introgression within various host genetic backgrounds

The symbiotic introgression method allows to transmit symbionts from a donor line to a recipient line while conserving most of the genetic background of the recipient line. As *Wolbachia* is a maternally transmitted bacterial symbiont, this method consists here in making a first cross between *Wolbachia*-infected females (here, $n = 20$) from the donor line with *Wolbachia*-uninfected males (here, $n = 10$) from the recipient line. Then, the F1 progeny of this previous cross carries the *Wolbachia* symbionts from the donor line and shares half of its genetic background between the donor and the recipient lines. Two additional backcrosses between females ($n = 20$) from the F1 (and then F2) progeny and males ($n = 10$) from the recipient lines are necessary to restore at the F3 generation 87.5 % of the genetic background of the recipient line (Figure 1).

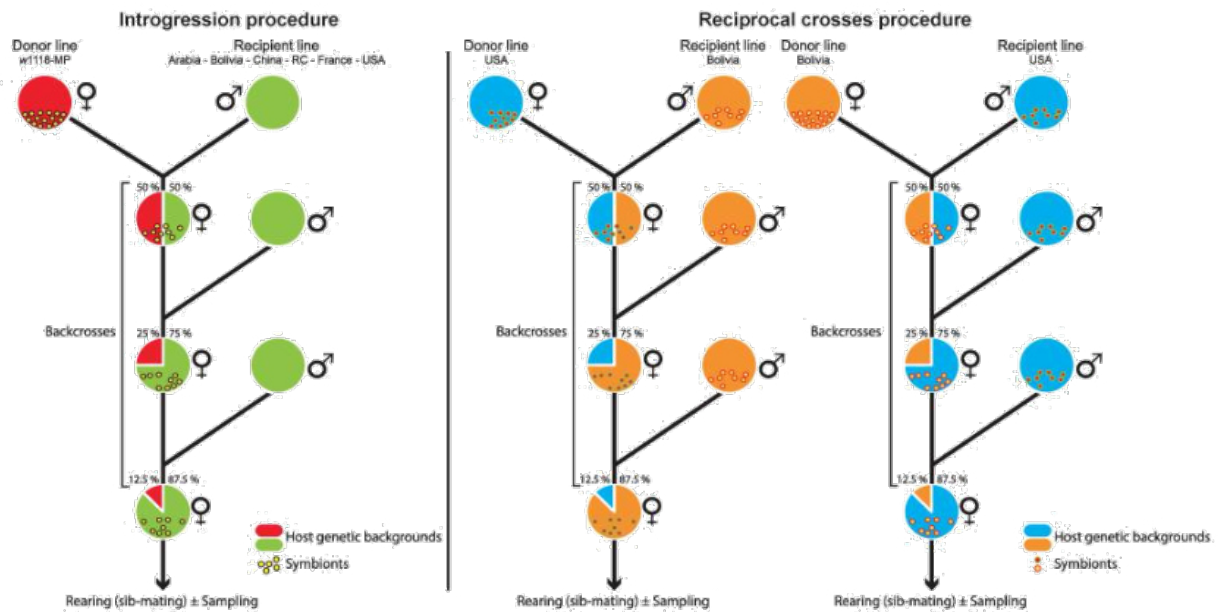


Figure 1: Introgression and reciprocal crosses procedures. Transmission of symbionts from females of the donor line to a recipient line. Serial backcrosses were performed to restore the recipient host genetic background by mating daughters from the previous cross with males from the recipient line. This method was applied to infect the 6 natural *Drosophila melanogaster* populations by *wMelPop* (experiment #1, left panel), to perform new introgressions from Bolivia or USA on 3 replicates (experiment #2, left panel) and to conduct reciprocal crosses (experiment #3, right panel).

We first applied this method to infect the 6 natural *Drosophila melanogaster* population lines by the *wMelPop* strain (experiment #1, MP1 lines). For this purpose, we used an iso-female *w1118* line infected by *wMelPop* (IsoA3) as the donor line and the other populations as recipient lines (1 introgression / line). After two generations of regular sib-mating, flies were placed in egg-laying cages for sampling (see ‘rearing and collection’ protocol above), and infection patterns (*i.e.*, *wMelPop* relative density and the average *Octomom* copy number per bacteria in flies) were checked by qPCR in these lines.

As the introgression of *wMelPop* in different recipient lines (experiment #1) resulted in different infection patterns (*i.e.*, density and number of *Octomom* copies), we tested 8 generations later (experiment #2) the replicability of the infection pattern after a new introgression procedure. For this purpose, we selected two recipient lines (USA and Bolivia) that exhibited extreme infection patterns after introgression (*i.e.*, USA-MP1 exhibited a high *wMelPop* density whereas Bolivia-MP1 exhibited a low *wMelPop* density, see results), and performed anew 3 independent symbiotic introgressions, using the same iso-female line (IsoA3, 12 generations after the first introgression procedure) as the donor line and these two populations (USA and Bolivia) as recipient lines. After 3 generations of backcrosses, Bolivia-MP2 and USA-MP2 flies were maintained under regular sib-mating (except the generation preceding each sampling, for which the larval density was controlled as described above).

In parallel to experiment #2, we independently performed reciprocal crosses between the Bolivia-MP1 and USA-MP1 lines (*i.e.*, lines infected by *wMelPop* during the first introgression experiment) to test the respective influence of host and symbiotic genetic backgrounds on the *wMelPop* proliferation within flies. For this purpose, we reciprocally backcrossed Bolivia-MP1 and USA-MP1 individuals for 3 generations (experiment #3; 3 independent replicates), 8 generations after experiment #1. After 3 backcrosses, flies were maintained under regular sib-mating (except the generation preceding each sampling, in which the larval density was controlled).

Quantification of *wMelPop* density and *Octomom* copy number

Wolbachia density and *Octomom* copy number were measured on 7-day old females ($n = 10$ flies / line (experiment #1) and $n = 5$ flies / line / timepoint (experiments #2 and #3)), whose DNA was extracted using the EZ-10 96-well Plate Animal Genomic DNA® kit (Bio Basic). In brief, flies were individually crushed in 400

μL of lysis buffer by a sterile 5-mm stainless bead shaken by a TissueLyser[®] (Qiagen) for 30 s at 25 Hz. DNA was extracted following the instructions from the manufacturer, eluted in 100 μL of elution buffer and stored at -20°C .

Relative *Wolbachia* density and Octomom copy number were quantified from the same DNA extract by quantitative real-time PCR using SYBR[®] green and following the MIQE guideline applied to DNA samples (Bustin *et al.* 2009). To quantify the average amount of *wMelPop* per fly, we used primers targeting a monocopy reference gene in the host (*RP49* in *Drosophila melanogaster*) and primers targeting a monocopy gene outside of the Octomom region in *Wolbachia* (*WD0505* in *wMelPop*). Then, we normalized the number of copies of *WD0505* by the number of copies of the reference gene *RP49* to estimate the relative density of *wMelPop* per fly (Monnin *et al.* 2020). To quantify the average Octomom copy number of the *wMelPop* population within a fly, we used primers targeting the same gene located outside the Octomom copy number in the *wMelPop* genome (*WD0505*) and primers targeting a gene inside the Octomom region (*WD0513*). Then, we normalized the number of copies of *WD0513* by the number of copies of *WD0505* to estimate the mean Octomom copy number of the *wMelPop* population per fly (Chrostek *et al.* 2013). The sequences of the primers used (synthesis by Eurogentec[®]) are available in the Table s1.

The PCR amplifications were performed on a CFX96[®] instrument (Bio-Rad), independently for each target gene. Four μL of a diluted DNA sample (1/25), 0.5 μL of each forward and reverse primer (10 μM) and 5 μL of SsoADV Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) were used, for a total volume of 10 μL . The reaction conditions for amplification were 95°C for 3 min of preincubation, followed by 40 cycles of $\{95^\circ\text{C}$ for 10 s for denaturation, 60°C for 10 s for hybridization and 68°C for 15 s for elongation $\}$. The mean primer efficiencies were calculated using 6 points (in duplicate) from a 10-fold dilution series (10^3 to 10^8 copies) of previously purified PCR products (Table s1). The cycle quantification (Cq) values were estimated by the regression method, and the mean Cq value between technical duplicates was used for the determination of individual DNA quantities (deviation between duplicates below 0.5 cycles).

Statistical analyses

We used the R software (version 4.0.3) for all analyses (R Core Team, 2020). Density and Octomom copy number ratios were estimated and normalized from the Cq values using the EasyqpcR package (Le Pape 2012), based on the qBase algorithms published by Hellemans *et al.* 2007, taking into account the efficiency of primers. We first used a control sample from an aliquoted DNA extract (*w1118* line infected by the *Wolbachia wMelCS* strain) as a calibrator, to estimate the inter-plate variability. We took this variability into account to normalize data between plates using the EasyqpcR package and determined the quantity of *WD0505* relative to *RP49* and of *WD0513* relative to *WD0505*. In addition, as the *wMelCS* genome contains only one copy of Octomom, we confirmed that the Octomom copy number measured was close to one and set its values to exactly 1. We used this transformation of the calibrator value as a standardization for all the samples.

The relative density data were analyzed using general linear models. Normality and homoscedasticity were checked graphically. The data on Octomom copy number were analyzed with general linear models with a gamma distribution, as the distribution of this factor did not fit to a normal distribution. We confirmed graphically that the gamma distribution used in the model fitted to the Octomom copy number data with the package *fitdistrplus* (Delignette-Muller & Dutang 2015). The significance of the factors in these models were checked graphically with confidence intervals and considering *p*-values.

In the first experiment, we focused on the overall effect of the host genetic background on the relative density and Octomom copy number. The host genetic background of the lineages was thus set as the explanatory variable. We used the method of contrasts with *p*-values adjusted by Tukey method to obtain the pairwise differences between the lineages for both the relative density and the Octomom copy number. To determine the potential role of Octomom in the control of the bacterial population, we estimated the correlation between the relative density and the Octomom copy number (log-transformed data) using a linear model with the average Octomom copy number set as an explanatory variable.

In the second and third experiments, we focused on the differences between replicates. Then, the replicate label was set as the explanatory factor. The statistical analyses were performed independently for the Bolivia and USA host genetic backgrounds. We also used the method of contrasts with *p*-values adjusted by Tukey method to obtain the pairwise differences between the replicates for both the relative

density and the Octomom copy number. We finally estimated the correlation between the relative density and the Octomom copy number (log-transformed data) using a linear model with the average Octomom copy number set as an explanatory variable. We performed these correlation analyses: 1) for each genetic background, separately for each timepoint, and 2) for each replicate line, with all timepoint grouped.

Results

To characterize the determinisms at play in the regulation of bacterial density, we first investigated if host genetic background can have an active influence on density levels. As the Octomom region is also involved in density regulation, we additionally tested the influence of its amplification on density levels and the potential interaction between host and bacterial genotypes on density levels.

Wolbachia introgression within various *Drosophila melanogaster* lines is associated with contrasted infection patterns

During a preliminary experiment, we checked the infection status of six *D. melanogaster* populations with contrasted genotypes, introgressed with the heterogeneous strain wMelPop originating from the same isoA3 line. When we quantified the relative *Wolbachia* density (Figure 2A) and the average copy number of the genomic region Octomom (Figure 2B) after the introgression protocol, we found contrasted infection patterns in the different *D. melanogaster* lines tested.

Both *Wolbachia* density and composition (*i.e.*, measured as the mean number of Octomom copies per *Wolbachia*) varied significantly among introgressed lines (Linear regression model; w1118 – MP; Population effect on relative density: $P = 2.33 \times 10^{-09}$; Population effect on Octomom copy number: $P = 2.19 \times 10^{-08}$; see statistical details in Table s2). Introgressed lines differed from each other (see pairwise comparisons in Table s3), with a maximum difference in bacterial density and mean Octomom copy number per *Wolbachia* of respectively 8.3 and 5.8-fold between Bolivia and USA lines (Table s2).

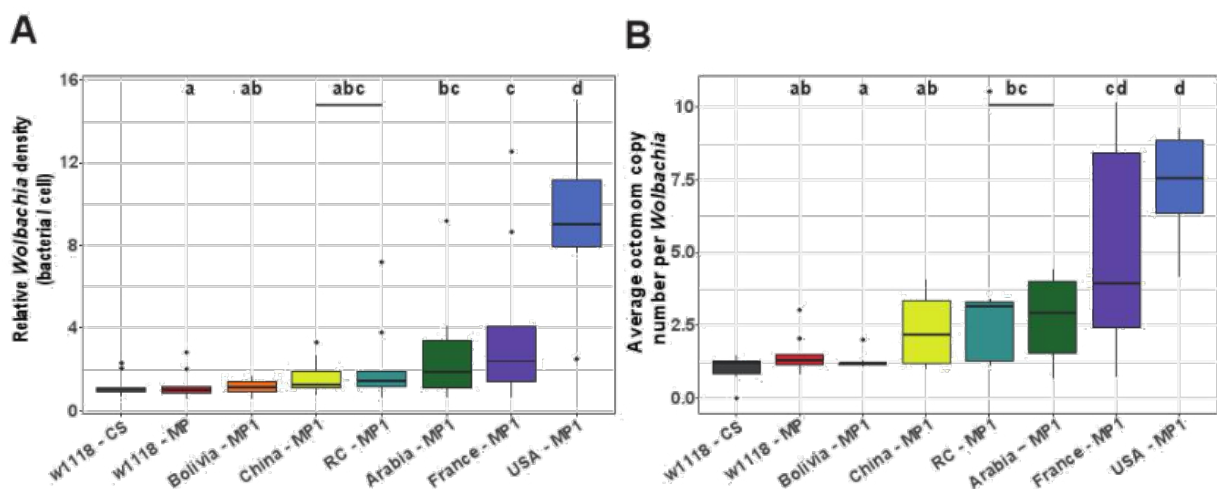


Figure 2: Infection patterns after introgression of *Wolbachia* in different host genetic backgrounds. 2A: relative *Wolbachia* density per cell, 2B: average Octomom copy number per *Wolbachia*. Each color represents a host genetic background ($n = 10$ flies / background). Box plots indicate ‘minimum’, 1st quartile, median, 3rd quartile, and ‘maximum’ \pm outliers (dots). Different letters above boxplots indicate a significant difference between lines after pairwise comparisons (Table s3). The w1118-CS line is an experimental control infected by wMelCS and is not integrated in the statistical analyses. The w1118-MP line, infected by wMelPop, is the line initially used as ‘donor’ for the introgression procedure. All the other lines were infected by wMelPop by introgression (MP1).

We observed a positive relationship between the relative density per line and the associated mean Octomom copy number per *Wolbachia* (Intercept = -0.40, SE(intercept) = 0.25, slope = 1.07, SE(slope) = 0.22, $r^2 = 0.83$, Linear regression model on the median of each host genetic background : $P = 0.005$; Figure

3). This strong correlation suggests that variation in the number of Octomom copies is a genetic mechanism involved in the control of bacterial density and confirms previous results highlighted by Chrostek et al. (2013). The number of Octomom repeats could thus provide a way to monitor the evolution of bacterial populations across generations and to better characterize selective pressures associated with the control of bacterial populations.

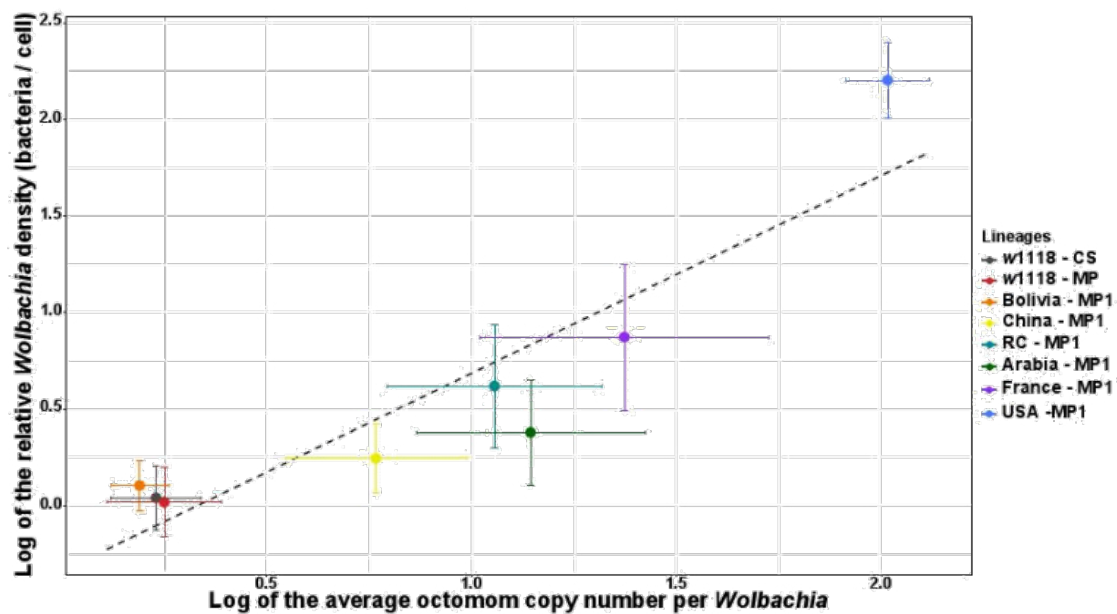


Figure 3: Relationship between the relative wMelPop density (log) and the average Octomom copy number per *Wolbachia* cell (log). Median \pm SE. Each color represents a host genetic background ($n = 10$ flies / background), and the dashed line represents the linear regression.

To summarize, we observed in this preliminary experiment a large variation of *Wolbachia* densities between the six lines of *Drosophila melanogaster* introgressed with the same wMelPop line – densities that were strongly correlated to the average Octomom copy number per *Wolbachia*. These results are consistent with the selection of specific variants by different host genetic backgrounds. However, other factors, like genetic drift by founder effect during the vertical transmission of symbionts from the donor line and / or from one host generation to another, could explain this pattern. To disentangle these hypotheses, we thus performed two sets of experiments using the two lines that exhibited the most extreme patterns of infection in the preliminary experiment (*i.e.*, Bolivia and USA).

The infection pattern can change rapidly over generations, regardless of the host genetic background

In the first set of experiments, we performed a similar introgression of the wMelPop *Wolbachia* strain in the Bolivia and USA genetic backgrounds, but established three independent replicate lines for each host background (Bolivia-MP2 and USA-MP2 lines). While the three replicates should exhibit the same response under host control, variation among the three replicates is expected under the drift hypothesis. We additionally evaluated the stability of the infection pattern over generations, by tracking the relative *Wolbachia* density (Figure 4A) and the average Octomom copy number per *Wolbachia* (Figure 4B) immediately after the first introgression event, after 13 generations, and after 25 generations (see Tables s4 & s5 for details).

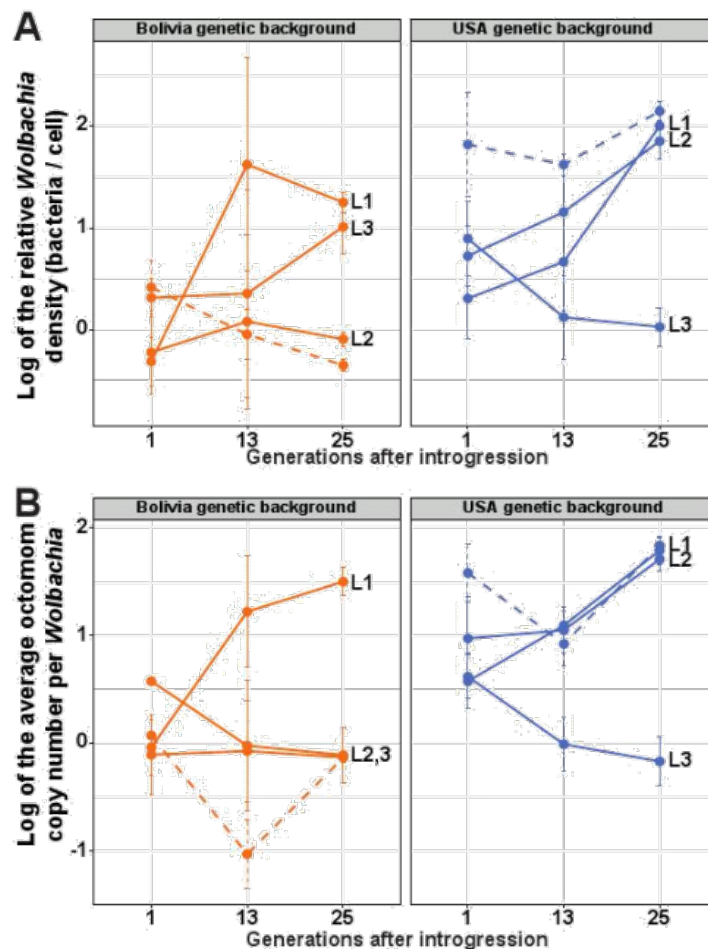


Figure 4: Replicability of the infection patterns after a new introgression procedure, and their evolution over generations. 4A: relative *Wolbachia* density (log; median \pm SE), **4B:** average Octomom copy number per *Wolbachia* (log; median \pm SE), $n = 5$ / line / timepoint. Each color represents a host genetic background. Plain lines represent the replicate lineages from the new introgression procedure (MP2), L1, L2 and L3 indicating the replicates. Dashed lines represent the lineages from the initial introgression procedure (MP1), which were set as references in the statistical analyses.

Just after the introgression event ($t = 1$), the relative *Wolbachia* density and the average Octomom copy number per *Wolbachia* did not differ significantly between the Bolivia-MP2 replicate lines and the Bolivia-MP1 line from the first experiment used here as the reference (Linear regression model; experiment group effect on relative density: $P > 0.1$; experiment group effect on Octomom copy number: $P > 0.1$; see statistical details in Table s4). The relative density and Octomom copy number in *Wolbachia* from the Bolivia-MP2 replicate lines did not differ significantly between replicates (see pairwise comparisons in Table s5), which does not contradict a host determinism for density regulation through Octomom copy number selection in this genetic background. However, at the same timepoint ($t = 1$), the relative density and the average Octomom copy number in *Wolbachia* from the USA-MP2 replicate lines tend to differ from the USA-MP1 line from the first experiment used here as the reference (Linear regression model; experiment group effect on relative density: $P = 0.08$; experiment group effect on Octomom copy number: $P = 0.025$; see statistical details in Table s4). The relative density and the average Octomom copy number in *Wolbachia* from the USA-MP2 replicates lines did not differ between replicates (see pairwise comparisons in Table s5) and the number of octomom copies per *Wolbachia* did not show significant difference with the donor line (w1118-MP) (Linear regression model; maternal transmission effect on Octomom copy number: $P = 0.35$; Table s4). These results are more consistent with a maternal transmission effect from the donor line to the recipient ones, with infection patterns mirroring the bacterial composition of the donor line.

We then examined the stability of the infection pattern over generations, for each replicate line (Figure 4). After 25 generations post introgression, the relative density and Octomom copy number per *Wolbachia* in Bolivia-MP2 and USA-MP2 replicate lines differed significantly from the quantities measured immediately after introgression (Linear regression model; generational effect on relative density: $P_{\text{Bolivia}} = 6.22 \times 10^{-06}$, $P_{\text{USA}} = 6.23 \times 10^{-05}$; generational effect on Octomom copy number: $P_{\text{Bolivia}} = 7.25 \times 10^{-04}$, $P_{\text{USA}} = 0.005$; see statistical details in Table s4). Moreover, the infection patterns between the Bolivia-MP2 or between the USA-MP2 replicate lines significantly differed (see pairwise comparisons in Table s5).

Finally, we noticed that the correlation between the bacterial density and the average number of Octomom copies per *Wolbachia* remained high over generations ($R^2 > 71\%$, Figure s2) and within lines, when variation in *Wolbachia* density was observed (Figure s3 and associated statistics).

All together, these results show an absence of host control on the density and composition of the bacterial population, and an influence of the number of Octomom copies on the control of *Wolbachia* densities. The variations observed between replicate lines and over time may thus reflect drift.

The bacterial composition initially transmitted strongly influences the patterns of infection observed over generations

In the second set of experiments, we performed reciprocal crosses to test the respective influence of the host genetic background, the bacterial population, the maternal effect of transmission, and drift on the wMelPop proliferation within flies (experiment #3). In order to jumble the host-*Wolbachia* associations, we made reciprocal crosses in 3 independent replicates using the Bolivia-MP1 and USA-MP1 lines from the first experiment, 8 generations after the latter. Then, to evaluate the stability of the infection pattern over generations, we measured the relative density of wMelPop (Figures 5A & 5B) and the average Octomom copy number per *Wolbachia* per fly (Figures 5C & 5D) one generation after the final homogenizing cross, 13 generations and 25 generations post introgression (see Tables s6 & s7 for details).

Just after the introgression event ($t = 1$), the relative density and the average Octomom copy number per *Wolbachia* differed significantly between the Bolivia(USA-MP1) replicate lines and the Bolivia-MP1 line (Linear regression model, experiment group effect on relative density: $P = 0.047$; experiment group effect on Octomom copy number: $P = 4.88 \times 10^{-09}$, see statistical details in Table s6), but not from the USA-MP1 line (Linear regression model, experiment group effect on relative density: $P = 0.798$; experiment group effect on Octomom copy number: $P = 0.586$, see statistical details in Table s6). In addition, the infection patterns of the Bolivia (USA-MP1) replicate lines did not differ significantly between them (see pairwise comparisons in Table s7). Similarly at the same timepoint, the relative density and the average Octomom copy number per *Wolbachia* from the USA(Bolivia-MP1) replicate lines differed significantly from those from the USA-MP1 line (Linear regression model, experiment group effect on relative density $P = 0.018$; experiment group effect on Octomom copy number $P = 6.31 \times 10^{-08}$, see statistical details in Table s6), but not from the Bolivia-MP1 line (Linear regression model, experiment group effect on relative density: $P = 0.416$; experiment group effect on Octomom copy number: $P = 0.559$, see statistical details in Table s6). In addition, the infection patterns of the USA(Bolivia-MP1) replicate lines did not differ significantly between them (see pairwise comparisons in Table s7). These results confirm an absence of control from the host on the establishment of the infection pattern and rather suggest a homogeneous symbiont transmission from the donor line.

Next, we examined whether infection patterns were stable within each of the replicate lines over generations by measuring the relative density and average Octomom copy number per *Wolbachia* 13 and 25 generations after the last backcross. After 25 generations post introgression, the relative density in Bolivia(USA-MP1) replicate lines differed significantly from their reference at $t = 1$ (Linear regression model, generational effect on the relative density: $P = 0.015$; generational effect on the Octomom copy number: $P = 7.79 \times 10^{-05}$, see statistical details in Table s6). On the contrary, the USA(Bolivia-MP1) replicate lines did not differ from their reference at $t = 1$ (Linear regression model, generational effect on the relative density: $P = 0.052$; generational effect on the Octomom copy number: $P = 0.059$, see statistical details in Table s6). Moreover, the infection patterns of the Bolivia(USA-MP1) replicate lines differed significantly from each other, as did the infection patterns of the USA(Bolivia-MP1) replicate lines (see pairwise comparisons in Table s7). All together, these results confirm an absence of host control on the density and composition of the bacterial population. Moreover, the variability observed between the replicates indicates a random transmission of the symbiont over generations.

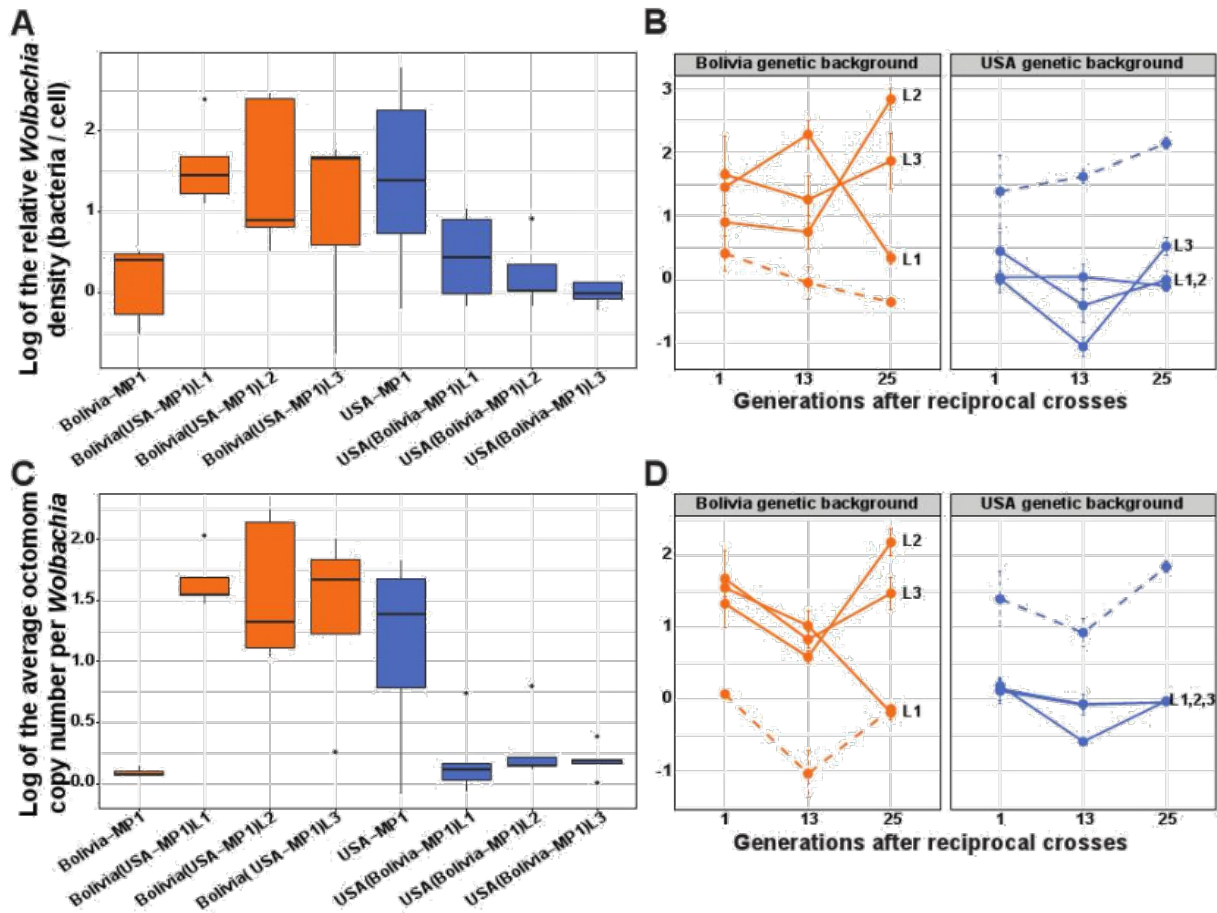


Figure 5: Evolution of infection patterns after reciprocal crosses. **5A:** Relative density (log) one generation post-introgression (box plot with 'minimum', 1st quartile, median, 3rd quartile, and 'maximum' \pm outliers (dots)). **5B:** Evolution of the relative density (log) over generations (median \pm SE). **5C:** Average Octomom copy number per *Wolbachia* (log) one generation post-introgression. **5D:** Evolution of the average Octomom copy number per *Wolbachia* (log) over generations (median \pm SE). $N = 5$ flies / line / timepoint. Each color represents a host genetic background and the information in brackets represents the bacterial genetic background. Plain lines represent the replicate lineages from the reciprocal crosses, L1, L2 and L3 indicating the replicates. Dashed lines represent the lineages from the initial introgression procedure (MP1), which were used as references in the statistical analyses.

Finally, we confirmed that the correlation between the bacterial density and the average number of Octomom copies per *Wolbachia* remained high over generations ($R^2 > 83\%$, Figure s4) and within the lines, when variation in *Wolbachia* density was observed (Figure s5 and associated statistics).

In conclusion, we failed to reveal any influence of the host genotype on the control of the wMelPop proliferation through the selection of bacteria containing high or low Octomom copy number. Instead, we found a strong maternal effect of transmission and an instability of the infection patterns over generations. These experiments lead us to consider that drift could be an important evolutionary force responsible for the diversification of infection patterns observed.

Discussion

In this study we sought to identify the determinisms involved in the regulation of endosymbiotic populations and used the *Drosophila melanogaster* – wMelPop symbiotic system to track the influence of host and symbiont genotypes on the density regulation, as well as the evolutionary forces at play. Indeed, this symbiotic model is particularly relevant because it exhibits genetic variability among the population of vertically transmitted symbionts, whose evolution can be tracked by a genomic amplification (Octomom).

While we first found large differences when comparing infection patterns (*i.e.*, bacterial density and average Octomom copy number per *Wolbachia*) in different host genetic backgrounds, such host control on bacterial proliferation/selection was not confirmed after new experiments of introgression on more replicate lines and crossing experiments between lines exhibiting the most extreme infection patterns. Instead, we showed that the infection patterns were initially set up by the bacterial genotype and became very unstable over generations. These results suggest that, in this symbiotic system and under these experimental conditions, drift strongly influences the evolution of the symbiont density –and thus its stability over generations–, contrarily to what is generally described in the literature of insect endosymbioses (e.g., Hosokawa, Kikuchi, Nikoh, Shimada, & Fukatsu, 2006; Mouton et al., 2003).

Numerous examples in insects support an active regulation of symbiotic populations by the host, with stable density over generations when the environment remains constant (Ikeda et al. 2003; Mouton et al. 2004, 2007; Funkhouser-Jones et al. 2018). The orchestrated modulation of the symbiont proliferation rate throughout insect development also suggests a fine-tuned host control of the bacterial density (Rio et al. 2006; Login et al. 2011; Vigneron et al. 2014). On the opposite, bacterial factors alone can also explain variation in bacterial densities within some hosts. For example, different strains of *Wolbachia* are known to exhibit different, but stable, density levels in the same host lines based on their genetic particularities (Mouton et al. 2003; Chrostek et al. 2013). Proliferation of symbionts within the host is under strong selection as it is a key factor influencing the trade-off between symbiont transmission (*i.e.*, the higher the symbiont density, the higher the probability of transmission) and virulence (*i.e.*, the higher the symbiont density, the higher the cost on host survival and fecundity) (Anderson & May 1982; Ewald 1983). This transmission/virulence trade-off often leads to an optimal density, which can be controlled by host or bacterial determinants. In insect hosts, the main molecular mechanisms that determine the abundance and composition of symbionts are associated with immune response (Lemaitre & Hoffmann 2007; Zug & Hammerstein 2015) or resource allocation (Kiers et al. 2003). Microbial communities can in turn select resistance mechanisms against host effectors or trigger antagonist regulators of the host immunity (Vallet-Gely et al. 2008; Lindsey 2020).

In the *D. melanogaster-wMelPop* system, however, we observed a strong instability of infection patterns. Because the introgression was limited to 87.5%, a few alleles from the donor background – different in each replicate line – could marginally influence the *Wolbachia* load. However, incomplete introgression should not affect the results of the experiment where lines with the two most extreme phenotypes were crossed. Alternatively, the high instability could be due either to an instability of the optimum, or to a large influence of drift that limits the ability of the system to reach the optimum. Our results, and notably the variations observed between replicate lines in controlled rearing conditions, rather suggest a strong influence of drift on the regulation of bacterial density. Bacterial factors, such as the number of Octomom copies, could fluctuate through time and be at the origin of variation in density levels. However, the genomic region ‘Octomom’ has recently been questioned regarding its involvement in the establishment of density levels. Initially, it has been shown that proliferation rate and virulence of wMelPop are correlated with genomic amplification of the Octomom region (Chrostek et al. 2013; Chrostek & Teixeira 2015, 2018), but this relationship has been challenged by Rohrscheib and her collaborators (Rohrscheib et al. 2016, 2017), who support that the virulence of wMelPop rather depends on an increase in the extrinsic rearing temperature. However, to exclude any influence of the Octomom copy number on *Wolbachia* growth and pathogenicity, these variables should be tested independently of the temperature (Chrostek & Teixeira 2017). At constant temperature, our results show a clear link between *Wolbachia* density in adults and the average number of Octomom copies per *Wolbachia*, and are in accordance with the current literature (Chrostek et al. 2013; Chrostek & Teixeira 2015, 2018; Monnin et al. 2020). While we cannot exclude that another gene or set of *Wolbachia* genes different from Octomom could determine symbiont density, the strong correlation between the density observed and the number of Octomom repeats in all the experiments (generally >80% when the density was variable) suggests that Octomom is the main determinant of bacterial density in this biological system and in our controlled conditions. Consequently, this genomic amplification can be used as a marker of bacterial diversity and evolution of our experimental system.

We can thus wonder why we observed such variability and temporal instability within lineages, and why drift overcame this potential bacterial regulation through Octomom? Indeed, this pattern contrasts with what is observed in already well-established symbioses, where one symbiont genotype is fixed

(Werren *et al.* 2008). In our experiments, we were able to show very similar levels of infection between mothers and daughters just after introgression or reciprocal crosses procedures, suggesting a maternal effect. However, instability detected across generations suggests that this maternal effect is probably non-genetic: when a large number of bacteria is quantified in the mother's tissues, a large number of bacteria is transmitted to the oocytes and maintained in the adult stage (Veneti *et al.* 2004; Hosokawa *et al.* 2007; Parkinson *et al.* 2016). However, there may still be random variability between mothers regarding the amount of bacteria transmitted to their eggs, and between these eggs (Mira & Moran 2002). Bottlenecks during transmission can thus eventually lead to a gradual shift of the 'initial' density over time. Bottlenecks can also influence density levels through random differential transmission of bacterial variants from one generation to the next (Funk *et al.* 2001; Kaltenpoth *et al.* 2010), especially if these variants exhibit different reproductive rates (as it is the case with variants carrying different numbers of Octomom copies (Duarte *et al.* 2021)). To summarize, if not counteracted by host or symbiont density control, drift is expected to induce instability over generations by a combination of quantitative (*i.e.*, transmission of a non-equivalent number of bacteria to the eggs) and qualitative/genetic (*i.e.*, random transmission of different variants) bottlenecks. Hence, the high variability and the temporal instability depicted in our study could reflect the random transmission of different *wMelPop* quantities and variants during transmission bottlenecks. In addition, drift at the transmission level alone cannot explain variation of the average density at the population level but should be associated to other factors. Drift at the host population level could play a role by fixing hosts with symbiotic populations with a different average of Octomom copy number. Alternatively, selection, or mutation bias could also play a role. For instance, the mutation rate of a repeated sequence in microsatellites can strongly depend on the number of motifs present in the sequence (Whittaker *et al.* 2003). Assuming the same rules on the number of Octomom copies present in the population (*i.e.*, a higher propensity for duplication when the number of copies is high), the outcomes of drift could be more unpredictable for individuals harboring the highest average number of Octomom copies. Indeed, in the presence of moderate bottlenecks and a mutation rate increasing with the number of copies, a strong variability of infection patterns is expected over generations. However, we did not observe such higher temporal instability when the values of density and Octomom copy numbers were high in the donor lines. These results suggest that the influence of the mutation rate was negligible compared to the transmission bottleneck. Under conditions of genetic instability linked to transmission bottlenecks, between-host selection should not be efficient, and would explain why the vertically transmitted *wMelPop* strain exhibits a strong virulence, whereas the overall alignment of interests between the host and vertically transmitted symbionts generally leads to the selection of low virulent symbionts that maximize host survival and indirectly their own transmission (Anderson & May 1982; O'Neill *et al.* 1997).

Different environmental conditions can also modify the optimum density of the symbiont. Optima can be different for the host and the symbionts, and lead to antagonistic interactions between symbiotic partners and to variations in bacterial density (Parker *et al.* 2021). In the *D. melanogaster* / *wMelPop* system, the maintenance of the virulence phenotype has thus frequently been associated with the fact that virulence is only expressed in conditions rarely observed in nature, so that the between-host selection against highly prolific variants (such as those with high Octomom copy numbers) is weak at 25°C. A recent study however shows that strains with 8-9 Octomom copies are pathogenic from 18°C to 29°C (Duarte *et al.*, 2021). In addition, another selective force, the within-host selection, could explain the virulence of *wMelPop* in certain environmental conditions. Indeed, when fly populations are reared at 28°C, Monnin *et al.* (2020) showed that the population evolved toward a higher virulence, which may be due to the stronger effect of within-host selection compared to between-host selection. Thus, when selective pressures are strong, within and between-host selection could modulate symbiont virulence in the *Drosophila-wMelPop* association, whereas drift might not allow any co-evolution between partners and co-adaptation to environmental changes when selective pressures are limited.

To conclude, we showed that the host did not control for bacterial density and composition in the symbiosis between *D. melanogaster* and *wMelPop*, and that the infection patterns were very instable across generations, suggesting a strong influence of drift that could limit the effects of within- and between-host selections. As the transmission of symbionts in vertically transmitted symbiosis is subject to potential bottlenecks both in terms of quantity and genetic diversity (Mira & Moran 2002; Galbreath *et al.* 2009; Kaltenpoth *et al.* 2010), it seems necessary to further characterize the intensity of bottlenecks in this

symbiotic system, in order to better evaluate the impact of drift on the evolution of bacterial populations in vertically transmitted symbioses and its impact on host phenotypes.

Data accessibility

Raw data are available online: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4607210>

Supplementary material

Additional figures are available online: <https://doi.org/10.1101/2020.11.29.402545>, supplementary material of version 4.

Scripts are available online: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4607223>

Acknowledgements

We thank Nicole Lara and Claire Traversaz-Erchoff for providing the *Drosophila* media. We also thank the DTAMB platform for providing us technical resources for molecular biology experiments. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche 'RESIST' program (ANR-16-CE02-0013-01) and performed within the framework of the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) and the SBP Micro-Be-Have of Université de Lyon, within the programme 'Investissements d'Avenir' (ANR-11-IDEX-0007; ANR-16-IDEX-0005). A previous version of this article has been peer-reviewed and recommended by Peer Community In Evolutionary Biology (<https://doi.org/10.24072/pci.evolbiol.100126>).

Conflict of interest disclosure

The authors declare that they have no financial conflict of interest with the content of this article. NK & FV are recommenders for PCI Evolutionary Biology.

References

- Abbot P, Moran NA (2002) Extremely low levels of genetic polymorphism in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids (*Pemphigus*). *Molecular Ecology*, **11**, 2649–2660. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01646.x>
- Alizon S, Hurford A, Mideo N, Van Baalen M (2009) Virulence evolution and the trade-off hypothesis: History, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 245–259. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x>
- Alizon S, de Roode JC, Michalakis Y (2013) Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters*, **16**, 556–567. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>
- Anderson RM, May RM (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, **85**, 411–426. <https://doi.org/10.1017/S0031182000055360>
- Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Truong DT, Scholz M, Armanini F, Ferretti P, Gorfer V, Pedrotti A, Tett A, Segata N (2017) Studying Vertical Microbiome Transmission from Mothers to Infants by Strain-Level Metagenomic Profiling. *mSystems*, **2**, e00164-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00164-16>
- Banks JA, Birky CW (1985) Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant, *Lupinus texensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 6950–6954. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6950>
- Birky CW, Fuerst P, Maruyama T (1989) Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, **121**, 613–627.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

- Chrostek E, Marialva MSP, Esteves SS, Weinert LA, Martinez J, Jiggins FM, Teixeira L (2013) *Wolbachia* Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLoS Genetics*, **9**, e1003896. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003896>
- Chrostek E, Teixeira L (2015) Mutualism Breakdown by Amplification of *Wolbachia* Genes. *PLoS Biology*, **13**, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002065>
- Chrostek E, Teixeira L (2017) Comment on Rohrscheib et al. 2016 “Intensity of mutualism breakdown is determined by temperature not amplification of *Wolbachia* genes.” *PLoS Pathogens*, **13**, 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006540>
- Chrostek E, Teixeira L (2018) Within host selection for faster replicating bacterial symbionts. *PLoS ONE*, **13**, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191530>
- De Bary A (1879) Die erscheinung der symbiose. Vortrag auf der Versammlung der Naturforschung und Ärzte zu Cassel. , **121**, 1–30. <https://doi.org/10.1515/9783111471839>
- Delignette-Muller ML, Dutang C (2015) {fitdistrplus}: An {R} Package for Fitting Distributions. *Journal of Statistical Software*, **64**, 1–34. <https://doi.org/10.18637/jss.v064.i04>
- Douglas AE (1994) *Symbiotic interactions*. Oxford University Press, 1994. ISBN: 9780198542940
- Douglas AE (2008) Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist*, **177**, 849–858. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02326.x>
- Douglas AE, Bouvaine S, Russell RR (2011) How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278**, 333–8. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1563>
- Douglas AE (2014) The Molecular Basis of Bacterial-Insect Symbiosis. *Journal of molecular biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.005>
- Duarte EH, Carvalho A, López-Madrugal S, Teixeira L (2021) Regulation of *Wolbachia* proliferation by the amplification and deletion of an addictive genomic island. *PLoS Genetics*, **17**, e1009612. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009612>
- Ewald PW (1983) Host-Parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **14**, 465–485. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.14.110183.002341>
- Funk DJ, Wernegreen JJ, Moran NA (2001) Intraspecific variation in symbiont genomes: Bottlenecks and the aphid - *Buchnera* association. *Genetics*, **157**, 477–489. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.2.477>
- Funkhouser-Jones LJ, van Opstal EJ, Sharma A, Bordenstein SR (2018) The maternal effect gene *Wds* controls *Wolbachia* titer in *Nasonia*. *Curr Biol*, **28**, 1692–1702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.010>
- Galbreath JGMS, Smith JE, Becnel JJ, Butlin RK, Dunn AM (2009) Reduction in post-invasion genetic diversity in *Crangonyx pseudogracilis* (Amphipoda: Crustacea): A genetic bottleneck or the work of hitchhiking vertically transmitted microparasites? *Biological Invasions*, **12**, 191–209. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9442-3>
- Hellemsans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, **8**, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biology*, **4**, 1841–1851. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040337>
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Fukatsu T (2007) How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect-bacterium mutualism? *Molecular Ecology*, **16**, 5316–5325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03592.x>
- Ijichi N, Kondo N, Matsumoto R, Shimada M, Ishikawa H, Fukatsu T (2002) Internal Spatiotemporal Population Dynamics of Infection with Three *Wolbachia* Strains in the Adzuki Bean Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *American Society for Microbiology*, **68**, 4074–4080. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4074-4080.2002>
- Ikeda T, Ishikawa H, Sasaki T (2003) Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, and the almond moth, *Cadra cautella*. *Zoological Science*, **20**, 153–157. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.153>

- Kaltenpoth M, Goettler W, Koehler S, Strohm E (2010) Life cycle and population dynamics of a protective insect symbiont reveal severe bottlenecks during vertical transmission. *Evolutionary Ecology*, **24**, 463–477. <https://doi.org/10.1007/s10682-009-9319-z>
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature*, **425**, 78–81. <https://doi.org/10.1038/nature01931>
- Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*, **25**, 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Le Pape S (2012) EasyqpcR : EasyqpcR for easy analysis of real-time PCR data at IRTOMIT-INSERM U1082. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.EasyqpcR>
- Lindsey ARI (2020) Sensing, signaling, and secretion: A review and analysis of systems for regulating host interaction in *Wolbachia*. *Genes*, **11**, 1–21. <https://doi.org/10.3390/genes11070813>
- Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A (2011) Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science*, **334**, 362–5. <https://doi.org/10.1126/science.1209728>
- López-Madrigal S, Duarte EH (2019) Titer regulation in arthropod-*Wolbachia* symbioses. *FEMS Microbiology Letters*, **366**, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz232>
- Mathé-Hubert H, Kaech H, Hertaeg C, Jaenike J, Vorburger C (2019) Nonrandom associations of maternally transmitted symbionts in insects: The roles of drift versus biased cotransmission and selection. *Molecular Ecology*, **28**, 5330–5346. <https://doi.org/10.1111/mec.15206>
- Min KT, Benzer S (1997) *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10792–10796. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10792>
- Mira A, Moran NA (2002) Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology*, **44**, 137–143. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-0012-9>
- Monnin D, Kremer N, Michaud C, Villa M, Henri H, Desouhant E, Vavre F (2020) Experimental evolution of virulence and associated traits in a *Drosophila melanogaster* – *Wolbachia* symbiosis. *bioRxiv*, 2020.04.26.062265, ver. 4 peer-reviewed and recommended by PCI Evol Biol. <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.062265>
- Mouton L, Henri H, Bouletreau M, Vavre F (2003) Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology*, **12**, 3459–3465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02015.x>
- Mouton L, Dedeine F, Henri H, Boulétreau M, Profizi N, Vavre F (2004) Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics*, **168**, 181–189. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026716>
- Mouton L, Henri H, Charif D, Boulétreau M, Vavre F (2007) Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis. *Biology Letters*, **3**, 210–213. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0590>
- O'Neill S, Hoffmann A, Werren J (Eds.) (1997) *Influential passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press. ISBN: 0198577869
- Parker BJ, Hrčák J, McLean AHC, Brisson JA, Godfray HCJ (2021) Intraspecific variation in symbiont density in an insect-microbe symbiosis. *Molecular Ecology*, **30**, 1559–1569. <https://doi.org/10.1111/mec.15821>
- Parkinson JF, Gobin B, Hughes WOH (2016) Heritability of symbiont density reveals distinct regulatory mechanisms in a tripartite symbiosis. *Ecology and Evolution*, **6**, 2053–2060. <https://doi.org/10.1002/ece3.2005>
- Poinsot D, Bourtzis K, Markakis G, Savakis C (1998) *Wolbachia* Transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host Effect and Cytoplasmic Incompatibility Relationships. *Genetics*, **150**, 227–237. <https://doi.org/10.1093/genetics/150.1.227>
- Rio RVM, Wu YN, Filardo G, Aksoy S (2006) Dynamics of multiple symbiont density regulation during host development: Tsetse fly and its microbial flora. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **273**, 805–814. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3399>

- Rohrscheib CE, Frentiu FD, Horn E, Ritchie FK, van Swinderen B, Weible MW, O'Neill SL, Brownlie JC (2016) Intensity of Mutualism Breakdown Is Determined by Temperature Not Amplification of *Wolbachia* Genes. *PLoS Pathogens*, **12**, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005888>
- Rohrscheib CE, Frentiu FD, Horn E, Ritchie FK, van Swinderen B, Weible MW, O'Neill SL, Brownlie JC (2017) Response to: Comment on Rohrscheib et al. 2016 "Intensity of mutualism breakdown is determined by temperature not amplification of *Wolbachia* genes." *PLoS Pathogens*, **13**, 2016–2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006521>
- Szathmáry E, Smith JM (1995) The major evolutionary transitions. *Nature*, **374**, 227–232. <https://doi.org/10.1038/374227a0>
- Tiivel T (1991) Cell Symbiosis, Adaptation, and Evolution: Insect-Bacteria Examples. in *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*, 170-178. L. Margulis & R. Fester (Eds.). MIT Press. ISBN: 9780262519908
- Tipton L, Darcy JL, Hynson NA (2019) A developing symbiosis: Enabling cross-talk between ecologists and microbiome scientists. *Frontiers in Microbiology*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00292>
- Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F (2008) Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 302–313. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1870>
- Veneti Z, Clark ME, Karr TL, Savakis C, Bourtzis K (2004) Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5366–5372. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5366-5372.2004>
- Vieira C, Lepetit D, Dumont S, Biémont C (1999) Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 1251–1255. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026215>
- Vigneron A, Masson F, Vallier A, Balmand S, Rey M, Vincent-Monégat C, Aksoy E, Aubailly-Giraud E, Zaidman-Rémy A, Heddi A (2014) Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Current Biology*, **24**(19) 2267-2273. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.065>
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Whittaker JC, Harbord RM, Boxall N, Mackay I, Dawson G, Sibly RM (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, **164**, 781–787. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.781>
- You H, Lee WJ, Lee WJ (2014) Homeostasis between gut-associated microorganisms and the immune system in *Drosophila*. *Current Opinion in Immunology*, **30**, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.06.006>
- Zug R, Hammerstein P (2015) *Wolbachia* and the insect immune system: What reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-host interactions. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01201>

***III. Influence des agents stressants pro-
oxydants et viraux sur l'association wMelPop -
Drosophila melanogaster***

III.1. Introduction

L'étude précédente sur les déterminants de la régulation de la densité de *wMelPop* montre que le nombre de copies d'*Octomom* est le facteur qui influence le plus significativement la densité chez *D. melanogaster*, et que l'hôte n'exerce pas d'influence suffisamment importante sur la densité pour que nous puissions la détecter avec notre protocole expérimental. Cette étude nous montre aussi que le nombre de copies moyen d'*Octomom* par bactérie par mouche est susceptible de changer entre les générations d'hôtes, sous l'influence de la dérive. Cependant, les expériences de cette étude ont été réalisées dans des conditions contrôlées (température de 25°C) pour lesquelles *wMelPop* n'imposait pas de coûts pour ses hôtes, ce qui pourrait limiter l'influence de la sélection naturelle. Dans un contexte où les conditions environnementales provoquent une déstabilisation de la balance coûts-bénéfices des symbiotes à l'égard de leurs hôtes, il est possible que l'on puisse caractériser l'influence d'autres forces évolutives que la dérive sur la variabilité du nombre de copies d'*Octomom* au cours des générations d'hôtes. Dans la nature, les insectes sont constamment soumis à des contraintes environnementales qui peuvent influencer l'expression des phénotypes liés à la densité de *Wolbachia* (Mouton et al., 2006) et qui peuvent, de fait, entraîner des conséquences sur la coévolution des partenaires symbiotiques (Clay, 2014; Martinez et al., 2016; May and Nelson, 2014; Weldon et al., 2013).

Dans le contexte actuel de changements environnementaux, il est nécessaire de comprendre l'impact de ces changements, afin d'en limiter les conséquences sur les écosystèmes et les activités humaines. La symbiose, relation ubiquitaire qui peut impacter l'expression du phénotype des organismes, est un élément déterminant dans la réponse des individus aux contraintes environnementales (Bénard et al., 2020). La

symbiose est donc un paramètre important à considérer dans les études qui cherchent à identifier les conséquences des changements environnementaux sur les organismes. D'une part, les symbiotes peuvent participer à la réduction des effets négatifs des perturbations environnementales (Corbin et al., 2017; Hopkins et al., 2017; Latef et al., 2016; Shapira, 2016) et, d'autre part, leur sensibilité à certaines contraintes environnementales peut limiter la valeur sélective des hôtes dans des conditions stressantes (Baker et al., 2018; Mouton et al., 2006; Reynolds et al., 2003).

Pour comprendre les conséquences des changements environnementaux sur les associations symbiotiques, plusieurs approches sont possibles. Des modèles prédictifs se basant sur les observations *in situ* des perturbations environnementales en cours permettent de prédire les limites critiques des organismes et la dynamique évolutive des espèces qui y sont contraintes (Cunning and Baker, 2014; Henry et al., 2017). Pour compléter ces modèles, il est nécessaire de construire un cadre de connaissances des processus moléculaires, physiologiques, écologiques pour formaliser et définir une gamme de paramètres appropriés pour implémenter ces modèles prédictifs. Les études expérimentales apportent ainsi une contribution essentielle à la construction de ce cadre de connaissances. L'étude expérimentale des effets de l'exposition ponctuelle et chronique aux agents stressants permet aussi de mieux définir les conséquences des interactions potentielles entre les agents stressants sur les organismes et leur évolution dans un contexte de changement environnemental, mais également de confronter les connaissances théoriques à des situations qui s'apparentent à un contexte plus naturel de stress multiple.

L'essentiel de mon travail de thèse s'inscrit dans cette démarche de recherche des conséquences des perturbations environnementales sur les organismes, en considérant la symbiose dans la réponse des organismes face à ces perturbations.

Afin de caractériser les impacts des environnements stressants sur les partenaires symbiotiques, nous nous sommes intéressés à l'association symbiotique entre *wMelPop* et *Drosophila melanogaster* dans des contextes environnementaux perturbant l'équilibre symbiotique. Bien que *wMelPop* soit une souche de laboratoire qui n'est pas associée naturellement aux drosophiles, elle présente de nombreux avantages pour l'étude des relations symbiotiques dans un contexte environnemental stressant, et permet une compréhension des mécanismes évolutifs en cours dans la réponse de l'association à des contraintes environnementales qui sont maintenues pendant plusieurs générations.

Nous avons donc soumis cette association symbiotique au virus C de la drosophile et/ou à l'agent pro-oxydant « paraquat », pour caractériser leur impact respectif sur la réponse de l'association à court terme (*i.e.*, après 1 génération de stress) et à moyen terme évolutif (*i.e.*, après évolution expérimentale sur 12-24 générations). Nous avons choisi ces agents stressants pour leurs capacités à modifier la balance coûts/bénéfices de *wMelPop* sur son hôte. Comme *wMelPop* protège efficacement les drosophiles contre des virus à ARN, cette balance sera orientée vers les bénéfices dans un contexte d'infection virale. Étant donné qu'une surcharge oxydative peut limiter la prolifération de *wMelPop* dans les tissus des drosophiles, elle peut conduire à une réduction des coûts imposés par la présence de *wMelPop*, mais elle peut aussi limiter les effets protecteurs dépendants de la densité en *wMelPop* dans un contexte d'infection virale. Cette approche expérimentale nous a permis à la fois d'identifier les réponses de l'association à une exposition ponctuelle à ces agents stressants mais aussi de caractériser le potentiel adaptatif de l'association dans un contexte d'exposition chronique.

Les résultats de cette évolution expérimentale en condition environnementales stressantes sont reportés et discutés dans deux articles, qui présentent des niveaux d'avancements différents pour être expertisés par des pairs.

- Article 2 : « Impact of a chronic ingestion of *Drosophila C virus* on the evolution of a fruit fly-*Wolbachia* symbiosis ». Ma contribution à cette étude a été dans la mise en place et le suivi de l'expérience d'évolution expérimentale, les échantillonnages, les mesures de traits d'histoire de vie, des traits bactériens et de quantification virale, les analyses statistiques, la production de figurés, l'écriture des parties « matériels et méthodes » et « Résultats » ainsi qu'une participation moins active à l'écriture des parties « Introduction » et « Discussion ».
- Article 3 : « Influence du stress oxydatif sur l'association wMelPop-drosophile et son implication dans la réponse antivirale de l'association symbiotique ». Ma contribution à cette étude a été dans la mise en place et le suivi de l'expérience d'évolution expérimentale, les échantillonnages, les mesures de traits d'histoire de vie, des traits bactériens et de quantification virale, les analyses statistiques, la production de figurés, et l'écriture des différentes parties sous la supervision de mes encadrant.e.s.

Ces deux études ont été réalisées dans le cadre de la même expérimentation, les méthodes employées sont donc très similaires et seront détaillées dans une première sous-partie. En préambule de ces articles / chapitres, un article de revue rédigé en collaboration avec mes encadrant.e.s de thèse est disponible en annexe VI.2. Cet article de revue nommé « Stress & Symbiosis : Heads or Tails? », publié en 2020 dans *Frontiers in ecology and evolution*, revient sur les impacts des agents stressants dans

les relations symbiotiques en général, et inversement, sur le rôle de la symbiose dans la réponse des organismes exposés aux agents stressants.

III.2. Matériel et méthodes utilisées pour l'évolution expérimentale dans des conditions environnementales stressantes

III.2.1. Description générale du protocole d'évolution expérimentale

Ce projet associe une approche d'évolution expérimentale, qui vise à faire évoluer les drosophiles colonisées ou non par *Wolbachia* dans des conditions de surcharge oxydative, dans un premier temps, puis dans des conditions de combinaison de stress oxydant et viral dans un second temps. Le suivi de la densité et de la composition de la population bactérienne, en association avec des mesures régulières de traits phénotypiques chez les drosophiles, permet de déterminer si la présence des symbiotes est associée à une adaptation rapide aux conditions de stress. Par ailleurs, des échantillonnages supplémentaires ont été réalisés avant et après évolution expérimentale afin de réaliser des mesures physiologiques, métaboliques et transcriptomiques pour caractériser les mécanismes impliqués dans la réponse directe au(x) agent(s) stressant(s), mais également les mécanismes qui ont été sélectionnés, et qui jouent donc un rôle majeur dans l'adaptation à ces nouvelles conditions stressantes. Ces données « -omiques » n'ont pas encore pu être exploitées pleinement pour être valorisées, et ne seront pas présentées dans les études ci-dessous.

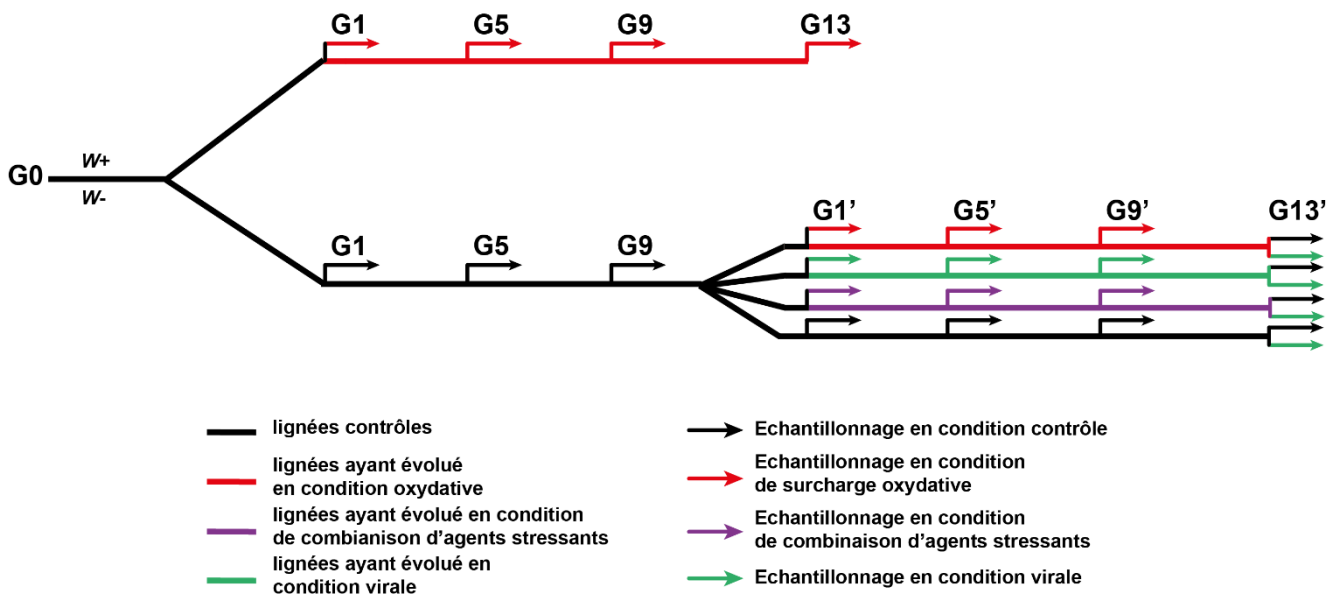


Figure III.1 | Schéma récapitulatif de l'évolution expérimentale en condition d'exposition aux agents stressants.

Effet direct des différents agents stressants sur l'association symbiotique : les échantillonnages ont été réalisés au début de l'expérimentation (G1) à la suite de la première inoculation du ou des agents stressants. Pour les échantillonnages liés aux conséquences d'une exposition ponctuelle à une surcharge oxydative, les mesures ont été réalisées à deux occasions (flèches rouges à G1 et G1'). Les échantillonnages des drosophiles exposées ponctuellement au DCV ont été réalisés à la G1', après la première exposition au virus (flèche verte), et à la G13' (pour la condition d'évolution « contrôlée », ligne noire puis flèche verte).

Effet chronique d'une infection virale sur l'association symbiotique : les échantillonnages en condition virale ont été réalisés à partir de la première inoculation de l'agent stressant (G1') puis répétés toutes les 4 générations jusqu'à la génération finale (G13'), pour un total de 4 échantillonnages pour les mesures de traits d'histoire de vie des hôtes (flèches vertes le long de la ligne verte entre G1' et G13'). Les échantillonnages qui ont permis la mesure de l'évolution des traits bactériens et de la quantification du titre viral ont quant à eux été réalisés au début et à la fin de

l'expérimentation d'évolution en condition d'infection virale (G1' et G13', ligne verte, flèche verte).

Effet chronique de la présence de paraquat, en combinaison ou non avec le virus sur l'association symbiotique : les échantillonnages ont été réalisés aux mêmes temps et de la même manière que pour l'évolution expérimentale en condition virale pour les mesures concernant les effets de agents stressants en combinaison. Les échantillonnages pour mesurer l'influence d'une exposition chronique au paraquat ont été réalisés sur 12 (G1' à G13', ligne rouge puis flèches noires) ou 24 générations [Note pour G1 à G24 : ces données n'ont pas été exploitées dans cette partie afin de pouvoir comparer les différents traitements de façon équivalente sur 12 générations d'exposition] sur des lignées indépendantes, toutes les 4 générations à partir de la première exposition pour les mesures de traits d'histoire de vie en condition de stress (flèches rouges (paraquat seul) ou flèches violette (paraquat + virus)), et au début et à la fin des expériences en absence de stress (flèches noires).

Effet de l'évolution en présence d'agents stressants sur la réponse de l'association symbiotique à un stress ponctuel viral : Les échantillonnages ont été réalisés à G1' et après 12 générations d'exposition aux agents stressants en condition d'exposition au DCV seulement (G1' flèches verte et violette et G13' flèches vertes).

III.2.2. Lignées et protocoles d'élevage ; protocoles d'induction des stress

Lignées de drosophile et souches de *Wolbachia*. Pour toute expérience d'évolution expérimentale, il est nécessaire de disposer d'une grande variabilité génétique parmi les populations d'hôtes et de symbiotes afin que la sélection puisse agir. À cette fin, nous sommes partis de populations de *Drosophila melanogaster* provenant de différents endroits du monde et de la souche virulente de *Wolbachia*

wMelPop qui présente des niveaux de densité hétérogènes liés à la région génomique hypervariable Octomom (souche fournie par Scott O'Neill (Monash University, Australie)).

Pour créer les lignées infectées par *Wolbachia*, nous avons sélectionné 6 populations qui ne portaient pas l'allèle principal de résistance au DCV au locus *pastrel* (polymorphisme nucléotidique simple non synonyme en position 521 ; protocole qPCR de (Martinez et al., 2016)) et avons introgressé wMelPop dans ces 6 fonds génétiques hôtes (lignées de (Bénard et al., 2021)). Nous avons créé des lignées homologues sans *Wolbachia* en supplémentant la nourriture avec de la tétracycline (50 µg par mL de milieu de culture de drosophile) pendant 2 générations, et restauré la microflore commensale des mouches en laissant ces femelles pondre dans un tube ayant contenu 20 mâles non traités pendant 2 jours pour "ensemencer" naturellement le milieu, notamment avec des bactéries issues de leur flore intestinale. Après 3 générations, la présence ou l'absence de *Wolbachia* a été vérifiée par PCR.

Nous avons ensuite produit 10 lignées répliques en mélangeant 15 femelles et 5 mâles de chacune des 6 lignées colonisées par wMelPop (10 répliques W+), ou de chacune des 6 lignées homologues sans *Wolbachia* (10 répliques W-). Les mouches ont été maintenues tout au long de l'expérience dans des conditions contrôlées dans des enceintes climatiques (25°C, 60% d'humidité, cycle jour/nuit 12:12).

Conditions d'élevage. A chaque génération et pour chaque lignée réplique, 200 œufs ont été déposés sur une capsule de milieu riche de 1,4 mL (pour 1 L de milieu : 73,3 g de farine de maïs torréfié, 76,7 g de levure de bière inactive, 8,89 g de poudre d'agar-agar, 4 g de Tegosept - Nipagine, 0,4 L d'eau distillée et 55,5 mL d'éthanol à 95%) placée dans un tube d'agarose. Au moment de l'émergence, les mouches des

lignées répliquées ont été placées dans des boîtes de pontes indépendantes (pour chaque lignée répliquée), scellées par un disque en plastique contenant un milieu riche remplacé tous les 2 jours. Pour laisser le temps à la sélection inter-hôtes d'agir, nous avons attendu 6 jours (en sachant que la mortalité des adultes peut survenir dès 4 jours) avant de transférer 200 œufs de chaque disque sur une capsule de milieu frais, à laquelle nous avons ajouté les différents agents stressants (voir la section inoculation des agents stressants).

Des tubes supplémentaires ont été préparés lorsque les traits d'histoire de vie ont été mesurés. Dans ce cas, les mouches ont été placées dans des tubes d'agarose supplémentés en sucre (10% de sucre) immédiatement après l'émergence. Les mouches femelles de chaque répliquée de chaque condition ont été collectées à G1 et G13 pour mesurer l'effet direct du DCV et du paraquat sur la densité relative bactérienne, le nombre moyen de copies d'Octomom, ainsi que sur le titre viral. Pour mesurer l'évolution des traits d'histoire de vie de *D. melanogaster* à travers les générations, des femelles ont été collectées à G1, G5, G9 et G13. L'évolution de la densité bactérienne, du nombre de copies d'Octomom et des charges virales au fil des générations a été quantifiée sur des mouches femelles collectées à G1 et G13.

Production du virus et infection orale. Le DCV a été produit et mesuré dans des cellules DL2 de la lignée de drosophile de Schneider, toutes deux fournies par Luis Teixeira/Ewa Chrostek (Instituto Gulbenkian de Ciência). Les cellules DL2 ont été maintenues dans le milieu pour drosophiles de Schneider complété avec 10 % de sérum fœtal de bovin et 1 % de pénicilline-streptomycine 10 000 U/mL (tout Gibco). Sept jours après l'infection (MOI : 2) dans le milieu de culture Schneider complété avec 1% de pénicilline-streptomycine 10 000 U/mL, la culture cellulaire a été collectée et congelée à -80°C pendant 40 minutes. La culture a été décongelée,

congelée à nouveau à -80°C pendant 40 min, et décongelée pour dégrader les cellules, et centrifugée à 4000g pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -80°C . Le titre du DCV a été calculé par la méthode de calcul du point final de Reed et Muench : des cellules DL2 dans des plaques à 96 puits ont été infectées par dilutions sérielles (facteur 10) de la suspension virale (Reed et Muench, 1938). La présence de DCV actif a été identifiée par la mort cellulaire ou des effets cytopathiques clairs, ce qui a permis d'estimer un titre de $4,22 \times 10^9$ TCID₅₀/mL. Des dilutions similaires avec des extraits de cellules DL2 qui n'ont pas été inoculés avec le DCV n'ont provoqué aucun effet cytopathique en culture.

Les mouches anesthésiées au CO₂ ont été piquées dans la suture pleurale du thorax avec une aiguille en acier anodisé de 0,15 mm de diamètre plongé au préalable dans la solution de DCV, comme décrit dans (Martinez et al., 2014). Après les injections, les mouches ont été conservées dans des flacons de milieu riche, 30-40 mouches par flacon (cycle L/D 12/12, 25°C et 60% HR). Les mouches mortes mâles et femelles ont été collectées chaque jour du jour 3 au jour 6 après injection et stockées à -20°C (30 mouches ont été piquées sans plonger l'aiguille dans la solution de DCV pour contrôler l'absence de mortalité en l'absence d'infection par le DCV). Les mouches injectées ont été utilisées comme inoculum de DCV pour les conditions 'virales', en les déposant dans la capsule de milieu riche pour être ingérées par les larves de drosophiles (voir la section 'Inoculation des agents stressants').

Inoculation des agents stressants. L'agent pro-oxydant employé dans ces expériences est le paraquat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un herbicide provoquant une surcharge oxydative chez les insectes exposés (Bonilla et al., 2006; Jumbo-Lucioni et al., 2013; Rzezniczak et al., 2011). Le paraquat a été ajouté sur des capsules contenant le milieu de culture des larves de drosophiles en déposant 75 μL

de solution mère (80 mM). Ainsi, la concentration finale de paraquat dans le milieu nutritif est de 4 mM, ce qui assure un stress continu du paraquat pendant tout le développement larvaire. Cette dose en paraquat a été choisie à partir d'expériences préliminaires pour ses propriétés subléthales chez la drosophile. Pour l'étude des impacts de l'infection virale et de la combinaison des deux agents stressants, 6 cadavres de mouches congelées (mortes après une injection intrathoracique de DCV ; 3 mâles et 3 femelles) ont été ajoutés sur chacune des capsules supplémentées ou non avec du paraquat, afin d'inoculer le virus aux larves de drosophiles pendant leur développement. Cette procédure a été répétée à chaque génération pour l'étude de l'exposition chronique aux agents stressants.

III.2.3. Mesure des traits d'histoire de vie

Mesures de survie. La survie des mouches a été mesurée à G1, G5, G9 et G13. A l'émergence, 5 mouches femelles de chaque lignée répliquées (5x10 = 50 mouches pour chaque condition expérimentale) ont été placées dans des flacons contenant de la gélose supplémentée en sucre (10% de sucre), et la survie des mouches a été comptée chaque jour. Pour estimer l'effet direct du DCV sur la durée de vie des mouches, nous avons effectué des analyses de survie à l'aide du package R "Survival", et avons choisi la distribution logistique sur la base de la comparaison AIC des modèles statistiques et de représentations graphiques. L'infection par le DCV, la présence de paraquat et le statut de colonisation par *wMelPop* ont été définis comme variables explicatives dans nos modèles statistiques. Pour estimer l'effet chronique du DCV et du paraquat sur la durée de vie des mouches, nous avons calculé à chaque génération, pour chaque réplique de chaque condition, les temps létaux auxquels 25, 50, 75 ou 100% de la population sont morts (LT25, LT50, LT75 et LT100). Nous avons effectué des analyses de régression linéaire à l'aide du package R "lmer",

où l'infection par le DCV, la présence de paraquat et le statut de colonisation par *wMelPop* ont été définis comme variables explicatives, et les pools de générations et de réplicas comme variables aléatoires. L'influence des facteurs dans ces modèles a été estimée graphiquement avec des intervalles de confiance et en considérant les valeurs *P*.

Mesure des taux de développement. Les taux de développement des mouches ont été mesurés à G1, G5, G9 et G13 pour chaque réplica de chaque condition, en normalisant le nombre d'adultes émergeant dans le flacon par le nombre d'œufs (200) déposés sur la capsule. Pour estimer les effets directs et chroniques du DCV et du paraquat sur le taux de développement des mouches, nous avons effectué des analyses de régression linéaire en utilisant le package R "lmer". L'infection par le DCV et le statut de colonisation par *wMelPop* ont été définis comme variables explicatives, et les réplicas (et la génération pour l'effet chronique) comme variables aléatoires. L'influence des facteurs dans ces modèles a été vérifiée graphiquement avec des intervalles de confiance et en considérant les valeurs *P*.

Mesures de la taille des ailes. La taille des ailes des mouches a été mesurée à G1, G5, G9 et G13. Cinq jours après l'émergence, 5 femelles adultes par réplica et par condition ont été collectées et conservées dans un tube-Eppendorf de 2 mL à -80°C. Les ailes ont ensuite été détachées des carcasses à l'aide d'une paire de pinces sous une loupe binoculaire et montées sur des lames de microscope. La largeur des ailes a été mesurée à l'aide du logiciel AxioVision (Zeiss), qui mesure la distance entre des points de repère spécifiques sur des images acquises au microscope avec un grossissement x 25. Pour estimer les effets directs et chroniques du DCV sur la taille de l'aile de la mouche, nous avons effectué des analyses de régression linéaire en utilisant le paquet R "lmer". L'infection par le DCV, la présence de paraquat et le statut

symbiotique *wMelPop* ont été définis comme variables explicatives et les réplicas (et la génération pour l'effet chronique) comme variables aléatoires. L'influence des facteurs dans ces modèles a été vérifiée graphiquement avec des intervalles de confiance et en considérant les valeurs *P*.

III.2.4. Quantification des bactériens et du titre viral

Extraction d'ADN et d'ARN. La densité en *Wolbachia*, le nombre de copies d'*Octomom* et le titre viral ont été mesurés sur des mouches âgées de 3 jours à G1 et G13. A l'émergence, 5 mouches femelles de chaque réplica (50 mouches pour chaque condition) ont été placées dans des flacons contenant de la gélose supplémentée en sucre (10% de sucre) pendant 3 jours et ont ensuite été congelées à -80°C dans des tubes-Eppendorf de 2mL. L'ADN des mouches non infectées par le DCV a été extrait comme décrit dans (Bénard et al., 2021), en utilisant le kit xxx en plaques. L'ADN et l'ARN des mouches infectées par le DCV ont été extraits en utilisant le kit Biobasic all-in-one DNA/RNA Miniprep Kit. Les mouches ont été broyées entièrement et individuellement dans 400 µL de tampon de lyse à l'aide d'une bille stérile en acier inoxydable de 5 mm de diamètre et d'un TissueLyser (Qiagen). L'ADN et l'ARN ont été extraits selon les instructions du fabricant, élués dans 100 µL de tampon d'élution (ADN) ou 30 µL d'eau sans ARNase (ARN) et stockés à -80°C. Nous n'avons trouvé aucune différence entre les deux méthodes d'extraction concernant la quantification de la densité relative et l'estimation du nombre de copies d'*Octomom* en utilisant des échantillons similaires.

Quantification de la densité de *Wolbachia* et du nombre de copies d'*Octomom*. La densité relative de *Wolbachia* et le nombre de copies d'*Octomom* ont été mesurés en suivant les mêmes procédures que dans (Bénard et al., 2021). Les

données de densité relative et de nombre de copies d'Octomom ont été analysées à l'aide de modèles linéaires généraux avec distribution gamma, car les distributions ne correspondaient pas à une distribution normale. Nous avons confirmé graphiquement que la distribution gamma utilisée dans le modèle s'ajustait aux données observées avec le package `fitdistrplus` (Delignette-Muller and Dutang, 2015). Pour estimer l'effet direct du DCV et du paraquat sur la densité relative bactérienne et le nombre moyen de copies d'Octomom, la présence du DCV et de paraquat a été définie comme une variable explicative et les réplicas comme des variables aléatoires. Pour estimer l'effet chronique du DCV et du paraquat sur la densité relative bactérienne et le nombre moyen de copies d'Octomom, la présence du DCV et/ou de paraquat et la génération ont été définies comme variables explicatives et les réplicas comme variables aléatoires. La signification des facteurs dans ces modèles a été vérifiée graphiquement avec des intervalles de confiance et en considérant les valeurs P .

Quantification du virus. Le titre viral a été mesuré par PCR quantitative après transcription inverse, en suivant la directive MIQE appliquée aux échantillons d'ARN (Taylor et al., 2010). Pour quantifier la quantité moyenne de DCV par mouche, nous avons utilisé des amorces ciblant un gène de référence exprimé de manière constitutive chez l'hôte (facteur d'élongation 1α 100E (Ef1 α 100E) chez *Drosophila melanogaster*) et des amorces ciblant le DCV, et avons suivi le protocole développé par (Martinez et al., 2014), exceptées les spécifications mentionnées ci-dessous. Les réactions ont été réalisées sur un instrument CFX96 (Bio-Rad) en duplex avec des sondes utilisant les colorants HEX (DCV) et FAM (Ef1 α 100E), en suivant les instructions des fabricants). Quatre μ L d'un échantillon d'ARN dilué (1/50), 0,5 μ L de chaque amorce directe et inverse (100 μ M) mélangée avec des sondes et des colorants, 0,5 μ L de mélange de transcriptase inverse 20X et 5 μ L de master 2X fournis

dans le kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR ont été utilisés, pour un volume total de 10 µL. Les conditions de réaction pour l'amplification étaient les suivantes : 55 °C pendant 10 min pour la transcription inverse, suivie d'une préincubation à 95 °C et de 40 cycles de {95 °C pendant 10 s pour la dénaturation, 60 °C pendant 30 s pour l'annelage/l'élongation}. Les efficacités moyennes des amorces ont été calculées en utilisant 6 points (en double) d'une série de dilution de 10 fois (10^3 à 10^8 copies) de produits PCR préalablement purifiés. Les valeurs de quantification des cycles (Cq) ont été estimées par la méthode de régression, et la valeur Cq moyenne entre les dupliquas techniques a été utilisée pour la détermination des quantités d'ADN individuelles (écart entre les dupliquas inférieur à 0,5 cycle).

Les ratios de DCV ont été estimés et normalisés à partir des valeurs Cq à l'aide du package EasyqpcR (Le Pape, 2012), sur la base des algorithmes qBase (Hellemans et al., 2007) et en tenant compte de l'efficacité des amorces. Pour chaque plaque de qRT-PCR, nous avons utilisé 4 échantillons de contrôle provenant d'extraits d'ARN aliquotés (lignée *w1118* exempte de *Wolbachia* infectée par le DCV) comme calibrateurs, ce qui nous a permis d'appliquer un facteur de correction à toutes les plaques en utilisant le package EasyqPCR. Ensuite, nous avons déterminé la quantité de DCV par rapport à *Ef1α100E* en utilisant la méthode de Pfaffl avec des efficacités réelles (Pfaffl, 2001).

Les données log-transformées de la quantité relative de DCV ont été analysées par des modèles linéaires généraux. La normalité et l'homoscédasticité ont été vérifiées graphiquement. Pour estimer les effets directs et chroniques du paraquat et l'influence de *wMelPop* sur la quantité relative en DCV, le statut de colonisation par *wMelPop* et la présence de paraquat ont été définis comme variables explicatives et les répliques (et la génération pour l'effet chronique) comme variables aléatoires.

L'influence des facteurs dans ces modèles a été vérifiée graphiquement avec des intervalles de confiance et en tenant compte des valeurs P .

III.3. Article 2 : Conséquences phénotypiques et évolutives d'une infection virale sur l'association wMelPop-drosophile

III.3.1 Introduction

Hosts are associated with microbes, including bacteria and viruses, which can have a positive or negative impact on their fitness. These microbes not only interact directly with the host, but also with each other, and thus can indirectly impact host fitness. On the one side, viruses can limit bacterial proliferation by priming the host immune system. For instance, the latency of herpesviruses makes mice resistant against *Yersina pestis* through the production of cytokines and the activation of macrophages (Barton et al., 2007). On the opposite, the infection by some viruses can compromise tissue integrity, destabilize immune responses or alter the cellular environment and then influence the bacterial population composition (Almand et al., 2017). For example, infections by *influenza* viruses lead to changes in the composition of the respiratory and gastrointestinal tract microbiota (Hanada et al., 2018), and HIV infections are associated with altered microbial communities (Salas and Chang, 2014). These dysbioses in turn promote opportunistic bacterial infection, notably in the human respiratory and gastrointestinal tracts. Similarly, the mortality syndrome affecting the Pacific oysters results from infection with the *ostreid herpesvirus*, which compromises the immune system of oysters that fail to fight opportunistic *Vibrio* bacteria (de Lorgeril et al., 2018).

On the other side, bacteria can also negatively or positively interact with viruses and thus influence the host fitness. For instance, commensal mucosal bacteria play a key role in maintaining the immune homeostasis in the gut or respiratory tract. They provide a physical barrier and an antiviral protection through the priming of the immune defense (e.g., the human lung microbiota against *influenza* virus (Ichinohe et al., 2011)), the modification of the cellular environment (e.g., the *Lactobacillus*-dominated

vaginal microbiota against HIV (Tyssen et al., 2018)), or the secretion of antiviral molecules (e.g., the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* against bovine leukemia virus (Ferens and Hovde, 2000)). On the opposite, the presence of bacteria can compromise immune responses and favor the proliferation of virus. For instance, *Haemophilus influenzae*, a bacterium frequently found in patients with chronic pulmonary disease, increases viral binding and replication of rhinoviruses (Gulraiz et al., 2015). All together, these examples show that bacteria and virus can interact synergically or antagonistically depending on the timing of infection, the immune strategies selected to survive within the host, and the environment in which they proliferate.

Such host-bacteria-virus interactions also occur in insect, in which innate immunity is the primary response to fight pathogens (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Schneider and Imler, 2021). For instance, infection with the *Chikungunya* virus impacts bacterial communities in *Aedes albopictus* (Zouache et al., 2012) and gut bacteria such as *Acetobacter pomorum* stimulate host antiviral immunity in fruit flies (Sansone et al., 2015). But an additional level of interaction must be considered in insects, which often harbor endosymbionts located within host cells (Douglas, 2015). Such symbionts reside in the ovaries (when vertically transmitted), but also sometimes in other tissues, and can impact host fitness in interaction with other pathogens. For instance, the intracellular *Wolbachia* can protect some hosts against pathogens by decreasing their load and/or the fitness cost associated with the infection. This protective effect of *Wolbachia* has been discovered in *Drosophila melanogaster*, against RNA⁺ viruses (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Then, the blocking effect of *Wolbachia* (i.e., the decrease of virus load in insects in which the virus does not induce a fitness cost) combined with its capacity to spread rapidly in the population (thanks to the

manipulation of the host reproduction it induces) motivated its transfection in different mosquito vectors. The release of these transinfected mosquitoes in the field is promising to block Dengue, Chikungunya and Zika viruses and to limit the transmission of these arboviruses (Hoffmann et al., 2011; Ogunlade et al., 2021), even though questions remain on the evolutionary stability of this strategy (Vavre & Charlat 2012).

Insects fight bacterial or viral infections in different ways. Classical immune responses such as the activation of Toll and Imd pathways can be activated through the detection of microbial surface components or the release of microbial molecules (Lemaitre and Hoffmann, 2007). These pathways activate the synthesis of antimicrobial peptides or the expression of immune genes. In addition, the antiviral response is primarily activating the RNAi and the JAK/STAT pathways (Merkling and van Rij, 2013; Tafesh-Edwards and Eleftherianos, 2020). Viral restriction factors can also be involved in resistance against pathogens, such as *Pastrel* that confers resistance to *D. melanogaster* against *Drosophila C virus* (DCV) (Cao et al., 2017; Magwire et al., 2012). Symbiont-mediated viral blocking could in turn prime the host immune system (e.g., induction of oxidative stress and activation of stress-related genes) and/or limit the nutritional or cellular resources that are shared with viruses (e.g., lipids or nucleotides) (Pimentel et al., 2021; Terradas and McGraw, 2017). However, the route of infection of pathogens, either systemic (pricking) or oral (feeding), can influence the host immune response against bacteria (Gupta et al., 2017) or viruses (Ferreira et al., 2014b).

While the mechanisms of pathogen blocking, and insect protection are becoming better described the influence of multipartite interactions on the stability and evolution of such symbiotic associations is less explored. Indeed, the chronic effect of viral infections needs to be further considered, including its impact on bacterial and

viral population, as well as on host response. Letting a partner evolve under controlled conditions (*i.e.*, experimental evolution) appears to be key approach to determine how partners evolve. For instance, protective symbionts can influence the evolution of host resistance genes: when *D. melanogaster* flies evolved under DCV systemic infection for 9 generations, their resistance against DCV increased due to an increase in the frequency of the viral restriction factor *Pastrel* in the population. Resistance against DCV also increased in lines infected by the protective symbiont *Wolbachia*, but this resistance was associated with a decrease in the frequency of *Pastrel* in the fly population and no change in *Wolbachia* density (Martinez et al., 2016). When DCV virus was passaged 10 times through flies harboring the protective symbiont *Wolbachia*, specific viral genotypes were selected for, but they were not associated with an increase in virulence or a reduction in the protective effect of *Wolbachia* (Martinez et al., 2019). As for the evolution of bacteria, viral infection can alter the relative influence of selective forces such as within-host competition (where the most proliferative strain is selected) and between-host competition (where the most 'protective' strain is selected). For instance, fly populations having evolved for increased survival after systemic DCV infection carried a *Wolbachia* variant that, relative to the other variants, increased survival and fertility in presence of DCV and had a higher load (Faria et al., 2016). These experiments provide insight into the importance of multi-partner interactions and the possible evolution of such symbiotic systems in response to viral infection. However, two major difficulties remain: 1) systemic infection by pricking is not the natural route of infection and could interfere with the way interactions between partners occur (Ferreira et al., 2014b), and 2) the potential evolution of the bacterial population is difficult to trace, especially in vertically-transmitted bacteria whose genetic heterogeneity is limited.

To address the question of the evolution of host - bacteria – virus interactions in a natural context of symbiosis, we studied the association between *D. melanogaster*, *Wolbachia* and the *Drosophila C virus* (DCV). Indeed, DCV is an RNA⁺-virus belonging to the Dicistroviridae family (Huszar and Imler, 2008b), which naturally infects *D. melanogaster* flies through the ingestion of feces or dead cadavers (Gomariz-Zilber et al., 1998). DCV provokes the obstruction of the gut, preventing the correct assimilation of nutrients and leading to the death by malnutrition (Chtarbanova et al., 2014). We infected flies in the more natural way possible, that is the ingestion of viral particles through feeding during the whole larval stage (and not the injection of viral particles at the adult stage only). The use of the wMelpop *Wolbachia* strain is also relevant as this strain protects flies against DCV infection and exhibits a genetic heterogeneity in the number of repeats of a genomic region called Octomom. Interestingly, the Octomom copy number is positively correlated with the density of *Wolbachia*, its cost within the host, and its protective effect against virus (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013). This balance between the cost of harboring *Wolbachia* and the benefit of protection against virus can play an important role in the evolution of the association and the relative influence of between- and within-host selection. In addition, because the Octomom copy number is heritable (Chrostek and Teixeira, 2015), selection can occur, and part of the evolution of the bacterial population can be tracked using this proxy. In this study, we first characterized the effect of DCV ingestion during the larval stage on various host and bacterial life-history traits. Secondly, we investigated the evolution of these traits after 12 generations of ingestion of DCV and compared it with a control regime without DCV. Finally, we discuss the results in light of current knowledge in the fields of symbiont-mediated protection and blocking, and evolution of symbiotic associations.

III.3.2 Matériels et méthodes

Overview of the experimental evolution procedures. The 10 W^- -replicates and the 10 W^+ - replicates constitute the founding generation (G_f). These founding replicates were kept during 12 generations under the ‘control’ conditions (25°C, 60% relative humidity, 12:12 L/D cycle, controlled larval density (200 eggs)) before the start of the experimental evolution procedure (G_1), to limit any evolution associated with the change in the rearing conditions. We started the experimental evolution at generation G_1 , by rearing the 10 W^+ replicates and the 10 W^- replicates under two different conditions: ‘control’ and ‘+ virus’. In brief, we collected flies for various life-history trait measurements (host: survival, developmental rate, wing size; bacteria: density and Octomom copy number) throughout the experimental evolution procedure, in absence and/or presence of DCV (see Figure 1).

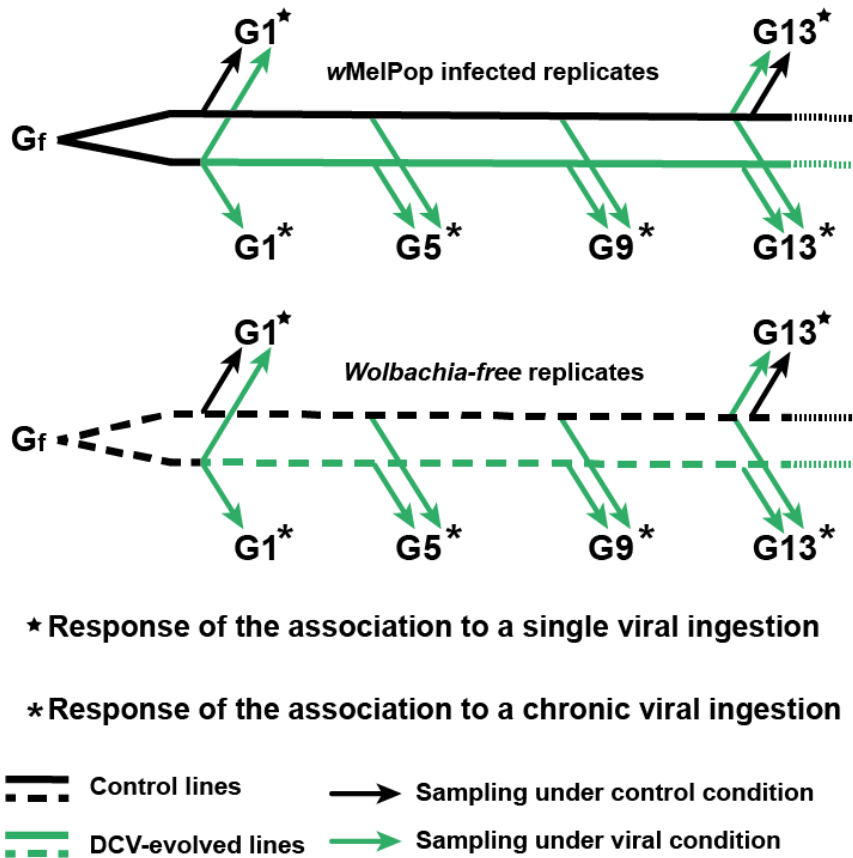


Figure 1: Experimental evolution procedure and fly collection.

Summary diagram of the experimental design used to evaluate the direct effect of DCV ingestion (at G1 or at G13) and the evolution of various traits through generations (phenotypic assays performed at G1*, G5*, G9*, G13*; bacterial and virus quantifications performed at G1* and G13*). Plain straight lines represent *wMelPop*-infected (W^+) replicates, and dashed straight lines represent *Wolbachia*-free (W^-) replicates. Black arrows represent collection of flies under control condition, and green arrows represent collection of flies under viral condition. As DCV was introduced in the experiment at G1, the green color starts at G1.

III.3.3 Résultats

To study the impact of the natural ingestion of a virus on the stability of symbiotic interactions and on the life history traits of the organisms, we characterized the responses of the symbiotic association to single and chronic viral infections. In particular, we measured the DCV load, different host life-history traits, and bacterial traits specific to *wMelPop* throughout the experiment.

wMelPop blocks DCV replication in orally infected flies.

First, we verified that the feeding of larvae on DCV-infected fly cadavers during their development lead to viral infection in emerging adults, and that the presence of *Wolbachia* protected their host. For that purpose, we measured the viral load in three-day-old flies harboring (or not) wMelPop *Wolbachia* (figure 2A). We performed this experiment independently twice to verify the effectiveness of the oral inoculation method and the repeatability of the measurements.

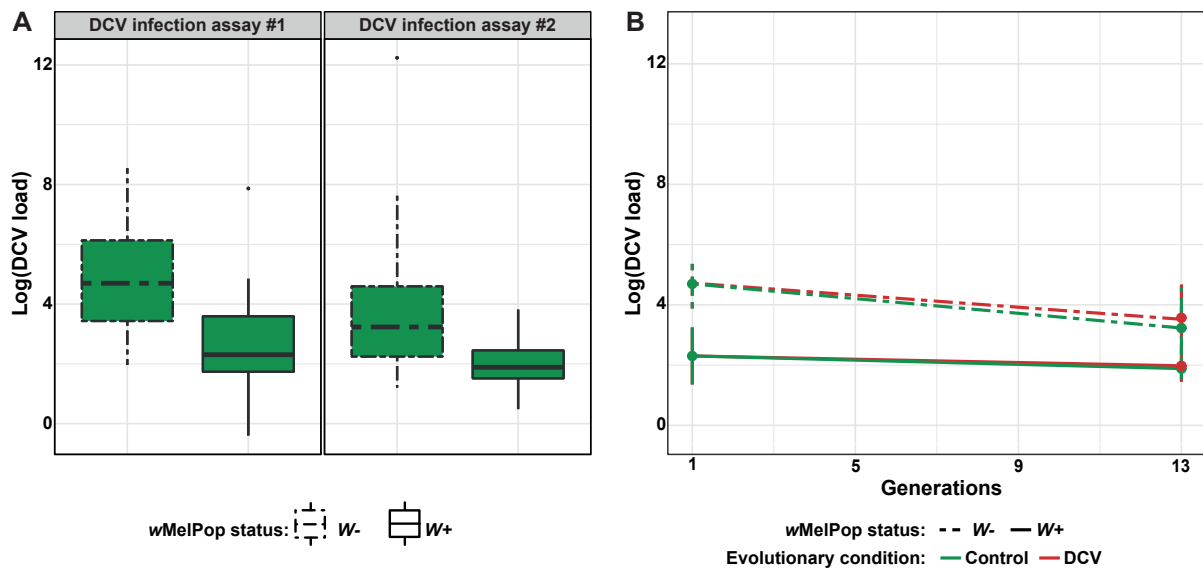


Figure 2: Effect of wMelPop on the DCV load after emergence, and its evolution over generations.

DCV load directly after viral ingestion (**2A**; $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition) (box plot with 'minimum', 1st quartile, median, 3rd quartile, and 'maximum' \pm outliers (dots)) and after chronic ingestion of DCV (**2B**; $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition / time point, median \pm SEM). The solid lines surrounding the box plots and connecting each timepoint represent wMelPop-harboring conditions. The dashed lines surrounding the box plots and connecting each timepoint represent *Wolbachia*-free conditions. The green color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers only at the generation of the measurement. The red color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers for 12 generations (starting from DCV assay #1).

We first confirmed that DCV infected both *Wolbachia*-free hosts (1st repetition: median (log [DCV]) = 4.70 ± 0.81 ; 2nd repetition: median (log [DCV]) = 3.23 ± 1.33) and wMelPop-harboring hosts (1st repetition: median (log [DCV]) = 2.31 ± 0.95 ; 2nd repetition: median (log [DCV]) = 1.89 ± 0.36). Besides, we identified a 2.03-log fold and

1.7-log fold reduction of viral load in *wMelPop*-harboring hosts. This reduction of the DCV load mediated by *Wolbachia* was significant for the first repetition (Mixed Linear Model (MLM); DCV load ~ *wMelPop*: $P = 0.003$) and near the significance threshold for the second repetition (MLM; DCV load ~ *wMelPop*: $P = 0.086$; see statistical details in suppl. 1.1).

To determine whether the evolution under viral pressure modified the ability of flies or bacteria to limit DCV infection, we measured the viral load of *Wolbachia*-free and *Wolbachia*-harboring flies from the 'DCV-evolved' lines (*i.e.*, lines having evolved for 12 generations under DCV oral infection) or from the 'control' lines (*i.e.*, lines having evolved for 12 generations without DCV infection) (figure 2B). As expected, viral load did not change in the 'control' lines after oral infection (MLM; DCV load ~ generations: $P > 0.1$). More surprisingly, the chronic viral pressure in 'DCV-evolved' lines did not induce any significant change in DCV load and *Wolbachia*-mediated blocking of DCV replication (MLM; DCV-load ~ generations x evolutionary-condition: $P > 0.1$, DCV-load ~ generations x evolutionary-condition x *wMelPop*-status: $P > 0.1$; see details in suppl. 1.2).

Altogether, these results show effective blocking of virus by *wMelPop* after DCV ingestion, but do not highlight any evolution of viral blocking after 12 generations of continuous viral pressure.

***wMelPop* protection after oral infection is stage specific.**

To assess whether the blocking of viral replication has consequences on host phenotype, we first measured the influence of DCV ingestion during the larval stage on various life-history traits, such as egg-to-adult survival rate (figure 3), survival (figure 4), and fly size (figure 5).

Because inoculation of the virus occurs at the larval stage, we first verified the impact of this viral ingestion on egg-to-adult survival. Following the ingestion of DCV-infected cadavers, fly larvae showed a decreased survival rate compared to control larvae that fed on uninfected cadavers (between 13% and 19% reduction; see figure 3A). The presence of *wMelPop* did not significantly increase the egg-to-adult survival rate (MLM; egg-to-survival-rate ~ DCV-infection: $P < 0.001$ in both experiments, egg-to-survival-rate ~ DCV-infection x *wMelPop*-status: $P > 0.1$; see details in suppl. 2.1).

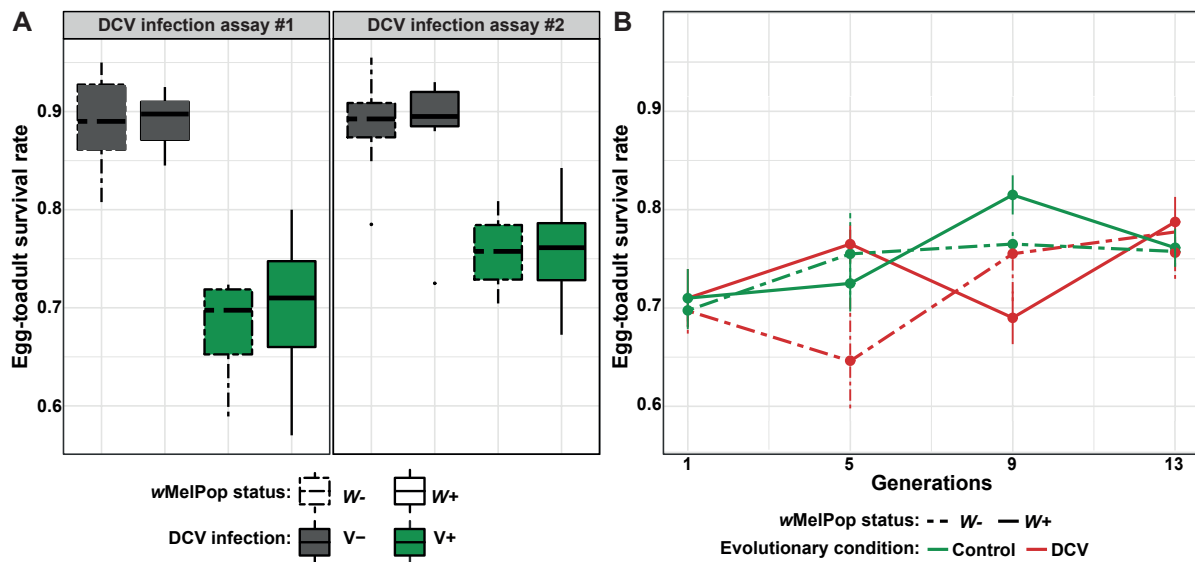


Figure 3: Effect of DCV on the egg-to-adult survival rate and its evolution over generations.

Egg-to-adult survival rate directly after viral ingestion (**3A**; 10 replicate lines / condition) (box plot with 'minimum', 1st quartile, median, 3rd quartile, and 'maximum' \pm outliers (dots)) and after chronic ingestion of DCV (**3B**; timepoints 1 & 13, 10 replicate lines / condition / timepoint; timepoints 5 & 9, 5 replicate lines / condition / time point, median \pm SEM). The solid lines surrounding the box plots and connecting timepoints represent *wMelPop* harboring conditions. The dashed lines surrounding the box plots and connecting timepoints represent *Wolbachia*-free conditions. The grey color represents the control condition where flies were never stressed. The green color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers only at the generation of the measurement. The red color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers for 12 generations (starting from DCV assay #1).

To determine whether evolution under chronic DCV ingestion selected mechanisms that increase larval survival upon DCV ingestion, we also followed the egg-to-adult survival rate of flies facing continuous viral pressure, every 4 generations

during 12 generations (*i.e.*, 'DCV-evolved' flies), and compared them to 'control' flies that ingested DCV only at the sampling generation (Figure 3B). The egg-to-adult survival rate varied over generations, but neither the experimental evolution condition, nor the presence of *wMelPop* influenced the observed variations (MLM; egg-to-adult-survival-rate ~ generations: $P = 0.003$, egg-to-adult-survival-rate ~ generations x evolutionary-condition: $P > 0.1$, egg-to-adult-survival-rate ~ generations x evolutionary-condition x *wMelPop*-status: $P > 0.1$; see statistical details in suppl. 2.2).

We then quantified the impact of viral ingestion during the larval stage on adult survival. Following ingestion of DCV-infected cadavers, *Wolbachia*-free adult flies survived significantly less than *wMelPop*-harboring adult flies (Figure 4A & 4B), and *wMelPop*-harboring flies exhibited the same mortality pattern as control flies that did not face the DCV (MLM; survival-probabilities ~ DCV-infection: $P < 0.05$, survival-probabilities ~ DCV-infection x *wMelPop*-status: $P < 0.05$ for both repetitions; see statistical details in supp 3.1).

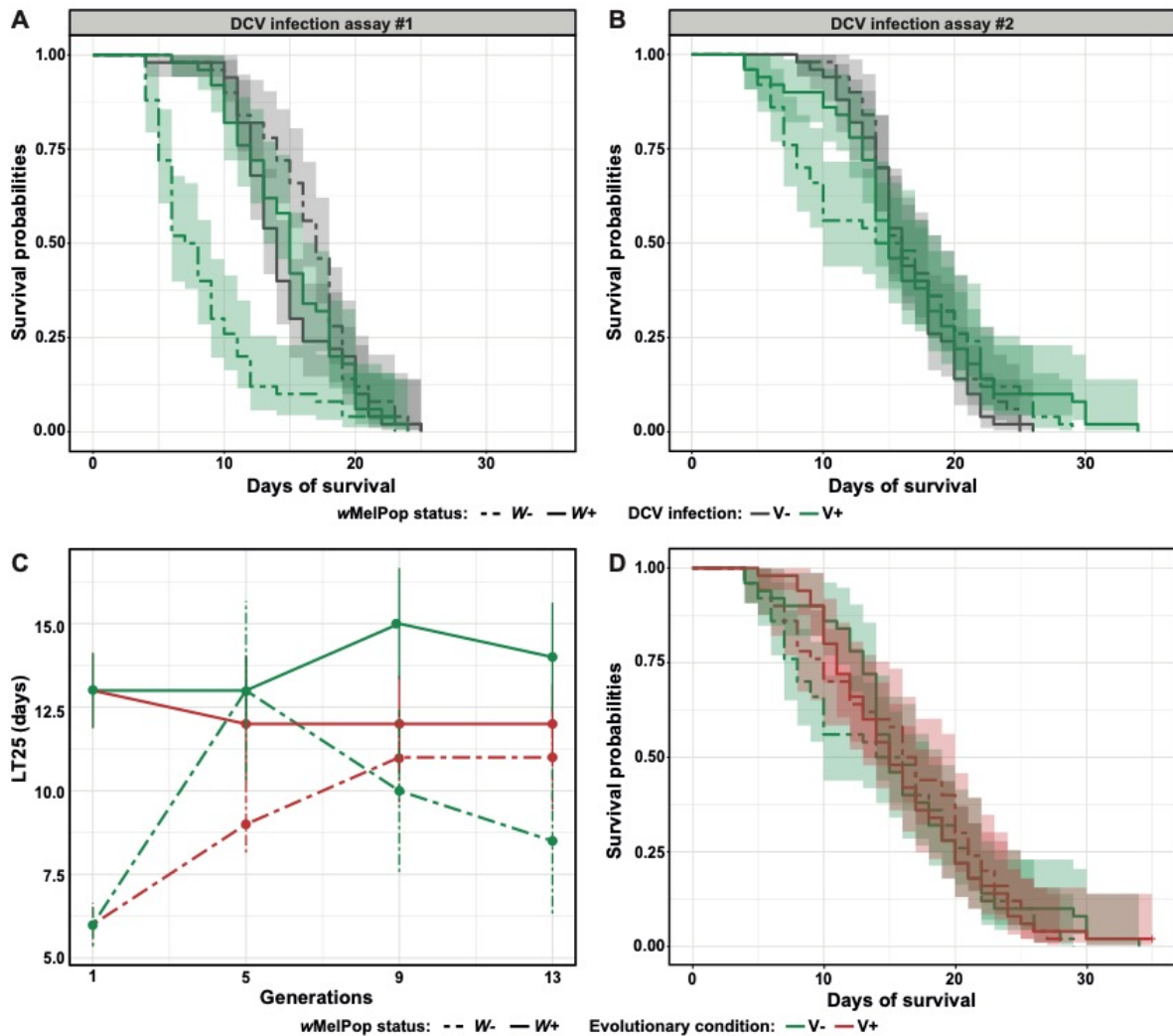


Figure 4: Effect of DCV ingestion on fly survival and *wMelPop*-mediated antiviral protection.

Fly survival directly after ingestion of DCV during the larval stage: first repetition (**4A**, $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition) and second repetition (**4B**, $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition). Median of the $LT_{25} \pm SEM$ (**4C**, timepoints 1 & 13, $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition / timepoint; timepoints 5 & 9, $n = 5$ / replicate line, 5 replicate lines / condition / time point) and survival probabilities of ‘control’ flies and ‘DCV-evolved’ flies at G12 (**4D**, $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition). The solid lines represent *wMelPop*-harboring conditions. The dashed lines represent *Wolbachia*-free conditions. The green color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers only at the generation of the measurement whereas the black color the condition where flies developed on uninfected cadavers. The red color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers for 12 generations (starting from DCV assay #1).

To determine whether evolution under chronic DCV ingestion selected mechanisms that increase fly survival upon DCV ingestion, we measured the survival of ‘DCV-evolved’ flies harboring or not *wMelPop* every four generations of evolution and compared them to ‘control’ flies that evolved under unstressed conditions but

ingested DCV only at the generation of the measurement (Figure 4C). We used 25%, 50%, 75% and 100% lethal time (LT) as metrics to track fly survival over generations and found that each LT, except LT100, varied significantly over generations (MLM; $LT_{25-50-75} \sim \text{generations}$: $P < 0.05$). However, we failed to reveal any statistical increase over generations driven by the experimental evolution condition (*i.e.*, continuous DCV infection or control) and/or the *wMelPop* harboring status (see statistical details in suppl 3.2). We also reached the same conclusion when comparing the survival curves of ‘DCV-evolved’ and ‘control’ flies at G12* (Fig 4D; MLM; survival-probabilities \sim evolutionary-condition: $P > 0.1$, survival-probabilities \sim evolutionary-condition \times *wMelPop*-status: $P > 0.1$; see statistical details in suppl. 3.2).

Finally, we tested whether the ingestion of DCV during larval development impacted host physiology by measuring the wing width as a proxy of fly size after DCV ingestion (Figure 6A). We found a slight but significant increase of the wing width in flies harboring *wMelPop* infected by DCV in the first repetition (3%), but not in the second one (MLM; wing-width \sim DCV-infection \times *wMelPop*: $P = 0.046$ in the 1st repetition and $P > 0.1$ in the 2nd repetition; see details in suppl. 4.1).

We also tested whether chronic ingestion of DCV had consequences on the host life-history traits by monitoring the wing size over generations (Figure 5B). We did not highlight any significant influence, neither of the generations nor the experimental evolution condition or the *wMelPop* status on the fly size (see statistical details in suppl. 4.2).

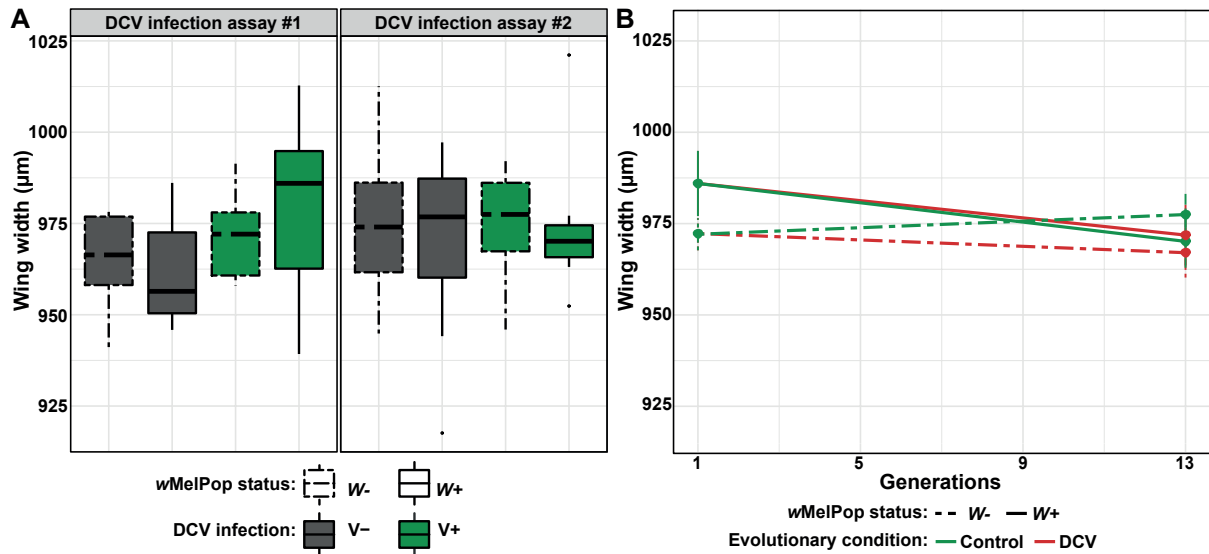


Figure 5: Effect of DCV on fly size and its evolution over generations.

Wing width (μm) directly after ingestion of DCV (**5A**; $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition) (box plot with 'minimum', 1st quartile, median, 3rd quartile, and 'maximum' \pm outliers (dots)) and after chronic ingestion of DCV (**5B**; $n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition / time point, median \pm SEM). The solid lines surrounding the box plots and connecting timepoints represent *wMelPop*-harboring conditions. The dashed lines surrounding the box plots and connecting timepoints represent *Wolbachia*-free conditions. The green color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers only at the generation of the measurement. The red color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers for 12 generations (starting from DCV assay #1).

Altogether, these results show that the ingestion of DCV had negative consequences on the survival of larvae and adults, but no effect on fly size. They also point out that *wMelPop* effectively protected its host after DCV ingestion in the adult stage, but not in the larval stage. Finally, these results show that neither hosts, nor *Wolbachia* adapted to chronic viral ingestion after 12 generations. Indeed, neither *Wolbachia*-free hosts nor *wMelPop*-harboring hosts chronically infected by DCV differed from their respective control.

The bacterial population does not evolve in response to chronic viral stress.

To better characterize the influence of DCV ingestion on *wMelPop* population, and the potential impact of changes in bacterial population on anti-viral response and host life-history traits, we quantified the density of *wMelPop* per fly (Figures 6A & 6C) as well as the average *Octomom* copy number per bacterium per fly (Figures 6B & 6D).

We made these measurements in 3-day-old flies that fed with DCV-infected cadavers during their larval development and compared them to control flies that fed with uninfected cadavers. The relative bacterial density did not significantly change in response to DCV ingestion (figure 6A; MLM; relative-density ~ DCV-infection: $P > 0.1$ in both experiments; see statistical details in suppl 5.1). Concerning the average *Octomom* copy number, we did not find any significant difference between control flies and those exposed to DCV in both repetitions (figure 6B; MLM; *Octomom*-copy-number ~ DCV-infection: $P > 0.1$ in both experiments; see statistical details in suppl. 6.1).

Then, we monitored the evolution of *Wolbachia* relative density and average *Octomom* copy number over generations by comparing 'DCV-evolved' flies with 'control' flies subjected to DCV ingestion only at the generation of the measurement. We did not find any significant variation in the number of bacteria or in the average *octomom* copy number over generations (figure 6C & 6D; see statistical details in suppl. 5.2 & 6.2).

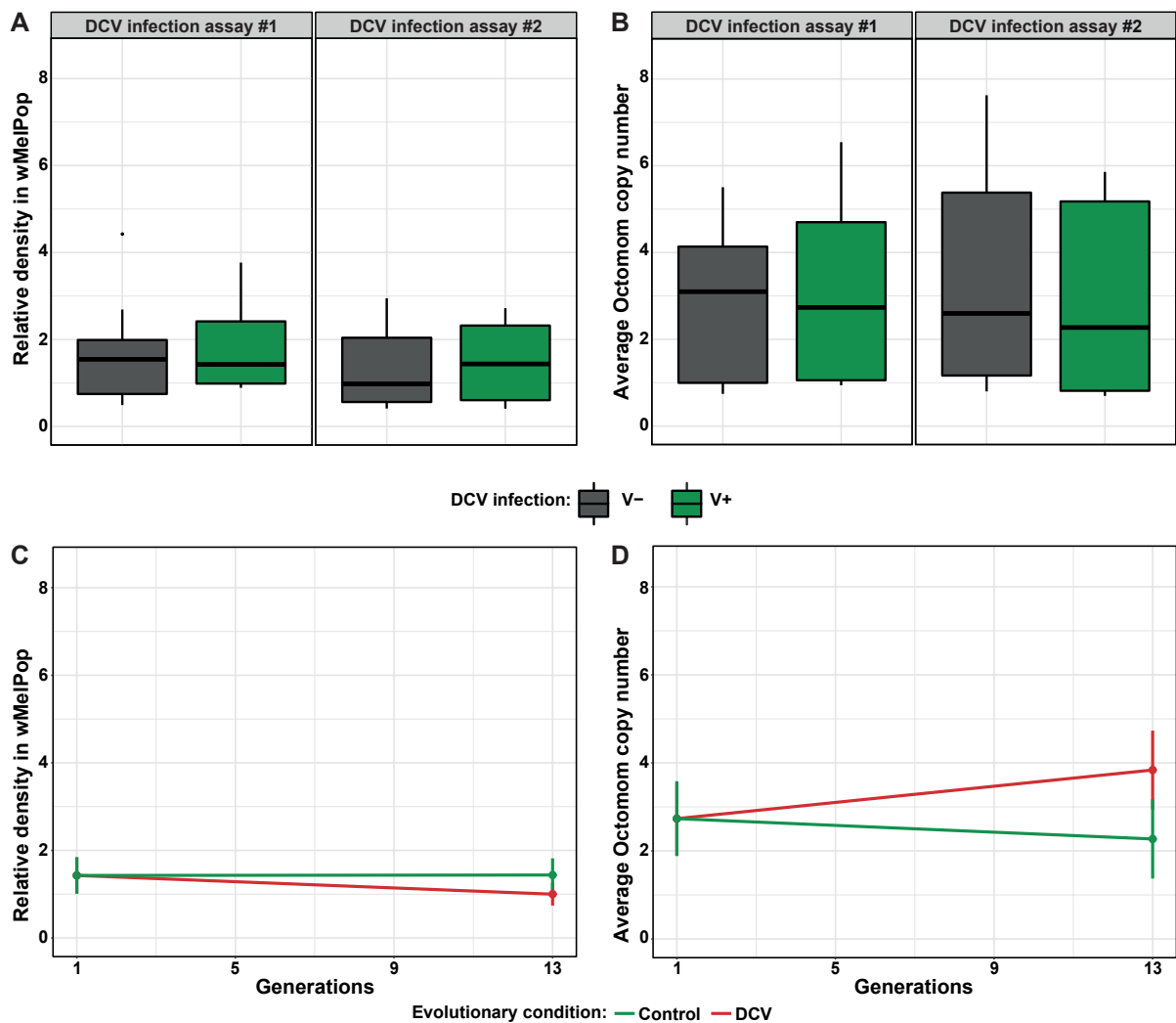


Figure 6: Effect of DCV on *wMelPop* relative density and average *Octomom* copy number.

Relative density in *wMelPop* (**6A**) and average *Octomom* copy number (**6B**) directly after viral ingestion ($n = 5$ / replicate line; 10 replicate lines / condition). Relative density in *wMelPop* (**6C**) and average *Octomom* copy number (**6D**) after chronic DCV ingestion ($n = 5$ / replicate line, 10 replicate lines / condition / time point, median \pm SEM). The green color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers only at the generation of the measurement whereas the black color represents the condition where flies developed on uninfected cadavers. The red color represents the condition where flies developed on DCV-infected cadavers for 12 generations (starting from DCV assay #1).

As the ingestion of DCV, either single or chronic, did not change bacterial traits, we further investigated the blockage of viral replication by estimating the correlation between relative density in *wMelPop* and DCV load (Figure 7), but could not find any significant correlation between both variables (Linear regression model; DCV-load \sim relative-density: $P > 0.1$ in both repetitions; see statistical details in suppl. 7).

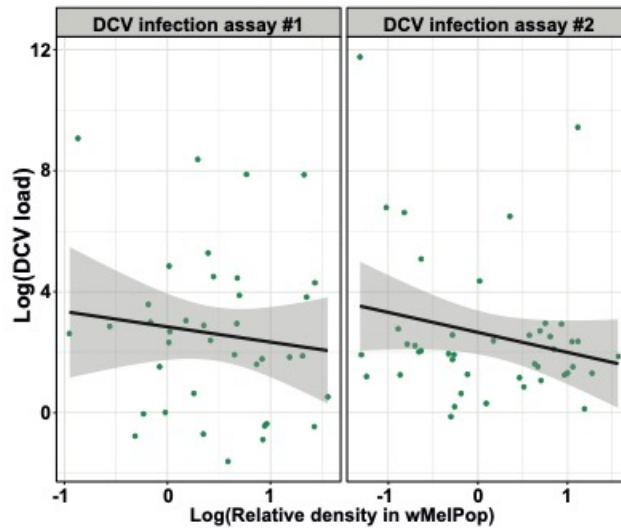


Figure 7: Correlation between *wMelPop* relative density and DCV replication blockage.

Each dot represents a fly harboring *wMelPop* and infected with DCV. The solid lines represent the linear regression between the Log of relative *wMelPop* density and the Log of DCV load.

Taken as a whole, these results pinpoint the absence of evolution of the symbiotic association in response to 12 generations of viral ingestion, although DCV induced mortality costs and *wMelPop* protected its host at least at the adult stage. These results did not show any correlation between the level of virus replication blockage and antiviral protection with bacterial density.

III.3.1 Discussion

We have shown that DCV can be pathogenic on larvae as well as on the resulting imagoes, when the larvae were fed with infectious dead flies. This mode of infection appeared to be homogeneous in terms of viral load and one of the most natural ways to infect flies, compared to feeding an infectious solution in the larval (Gomariz-Zilber et al., 1995; Mondotte and Saleh, 2018; Stevanovic et al., 2015; Villegas-Ospina et al., 2021) or adult stage (Ferreira et al., 2014b; Stevanovic and Johnson, 2015; Torri et al., 2020; Wong et al., 2016). Indeed cannibalistic or detritivorous feeding behaviors are observed in *D. melanogaster* larvae (Ahmad et al., 2015).

This mode of transmission exerted a significant selective pressure, as we estimated it killed 15 to 20% of the *Wolbachia*-free larvae and decreased their adult LT25 (time at which 25% of individuals are dead) by 5 days. These results are in accordance with (Villegas-Ospina et al., 2021), where the observed larval mortality varied from 10 to 35% depending on the stage at which larvae were contaminated by DCV-infected fly lysates. As observed in (Lautié-Harivel, 1992), DCV administered by feeding larvae on DCV-infected cadavers during development allowed its persistence into the adult stage, in contrast to DCV administered twice as a solution at the L1 stage that was cleared after emergence (Mondotte et al., 2018). We often observed diphasic survival curve, with a higher mortality rate during the 15 days following hatching (e.g., fig 4B and suppl. 3.2). These results suggest that flies which survived after this period either cleared the infection (Duneau et al., 2017) or tolerated it. For this reason, we studied the evolution of DCV-induced mortality using the LT25 metrics, which focuses on the mortality induced by DCV early in adulthood. We also expected viral kinetics to vary over time and to experience bottlenecks, especially during metamorphosis. Here,

we thus quantified viral loads at 3 days after emergence, to limit the effect of metamorphosis bottleneck, while ensuring that all flies were still alive and that inter-host competition did not occur yet.

Using this natural-feeding protocol, we could study the direct effect of DCV infection, as well as its interaction with *Wolbachia*. While DCV induced larval mortality, we did not observe any protective effect of *Wolbachia* in larvae, contrary to what was observed in (Stevanovic et al., 2015). Different strains of DCV have different tropisms for the digestive cells (Lautié-Harivel, 1992), which may impair the efficiency of *Wolbachia* protection. Preliminary data also suggest that high infection doses may limit the protective effect of *Wolbachia* in larvae (personal results) and that larval protection also depends on the interaction with gut microbes (Raquin et al., in prep). Further measurements of viral loads at the larval stage would indicate whether *Wolbachia* does not limit viral amplification at the larval stage or whether the blocking effect is not sufficient to provide protection. Microscopic observation could also indicate whether the localization of virus and *Wolbachia* in host tissues differs between larval and adult stages and limits the tripartite interaction.

We showed here that the presence of *Wolbachia* protected adult flies that fully developed on a DCV-infected medium, in the same way that it protects adult flies infected systemically by pricking (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2015; Teixeira et al., 2008). In addition, this protection was mediated by a blocking of DCV replication in early adulthood (*i.e.*, resistance). Inversely, the presence of DCV since the larval stage did not impact *Wolbachia* density or diversity (estimated here through the number of Octomom copies) during adulthood. Surprisingly, no correlation was highlighted between the bacterial density and the viral load at the individual level, while the correlation between bacterial density and Octomom copy numbers was confirmed.

This result is unexpected because of the positive correlation generally observed between *Wolbachia* density / Octomom copy numbers and the efficiency of antiviral protection (Chrostek and Teixeira, 2015; Chrostek et al., 2013; Duarte et al., 2021; Martinez et al., 2014, 2015; Osborne et al., 2012). However, these latter studies focused on the protective effect of *Wolbachia* density on survival rather than on its blocking effect on viral load. Another difference is that when both *Wolbachia* and viral load were quantified, the measurements were performed on independent pools of flies (Martinez et al., 2014, 2015), whereas we used the same individual extract to simultaneously quantify *Wolbachia* and DCV. Pooling flies could homogenize inter-individual variations and provide general trends that are not detectable at the individual scale. In addition, extraction at the body level could mask specific variations of *Wolbachia* and/or DCV loads in certain tissues (e.g.: gut, ovaries, head... (Osborne et al., 2012)) and limit the ability to detect fine correlations between *Wolbachia* and viral load in tissues where DCV resides (Martinez et al., 2015). However, a study of 14 tissues * infection time combinations in various *Drosophila* species did not reveal any consistent correlation between *Wolbachia* density and viral load at the tissue level (Kaur et al., 2020). Finally, *Wolbachia* load at the time of infection appears to better correlate with its antiviral efficiency than *Wolbachia* proliferation rate (Duarte et al., 2021). However, as infection occurred during the full larval development in our study system, such proxy was not possible to test.

Because the infection by natural feeding exerted a selective pressure both at the larval stage and at the adult age (6 days) at which we allowed flies to lay eggs for the next generation, we expected that the experimental evolution protocol would select for flies that survive better after DCV infection. This could include the selection of bacterial genes which encode for a higher replication rate or density (e.g., an increase

in the number of Octomom copies), and/or the selection of DCV resistance alleles others than *pastrel* / position 526 (Martinez et al., 2016).

In the *Wolbachia*-harboring populations, we did not detect any effect of the evolution treatment on the antiviral protection, which remained constant through time ($LT_{25} \sim 13$ days), nor on the evolution of the bacterial density or composition. As the Octomom copy number is heritable and can be (at least artificially) selected (Chrostek and Teixeira, 2015), these results could suggest that the selective pressure was not strong enough. Alternatively, the benefit of harboring protective symbionts could be counter-balanced with the cost of their presence within host tissues (Chrostek and Teixeira, 2015) and thus suggest that *Wolbachia* density (and indirectly the protective effect) was already at its optimal level.

In *Wolbachia*-free populations however, a marginally significant increase of survival was observed after DCV infection in 'DCV-evolved' populations at G13*, as well as a parallel increase in survival in the different 'DCV-evolved' replicate lines through time (Suppl. 3.2). The viral load appeared to be similar in 'control' and 'DCV-evolved' *Wolbachia*-free flies (Fig2), indicating that this small increase in survival would reflect a higher tolerance against DCV, rather than a higher resistance. This increase in tolerance would involve a host mechanism that specifically protect adults, as neither the *Wolbachia*-infection status nor the condition of evolution impacted the egg-to-adult survival rate. Such mechanisms could be deciphered in the future by monitoring changes in allele frequencies and/or in the expression of host genes involved in DCV tolerance, using PoolSeq and RNAseq approaches, respectively. However, this increase in tolerance should be regarded with caution as: 1) it was relatively limited compared to control lines, 2) the slight increase in adult survival (LT_{25} and LT_{50} , Suppl 3.2) visible through time in 'control' populations and the overall lower viral load at G13*

(Fig.2) could suggest a lower viral pressure at G13, which may interfere with the interpretation of tolerance evolution. A longer and/or more intense selection pressure would have allowed to see more distinct evolution patterns, as it was the case in (Martinez et al., 2016). However, while our selective pressure is limited compared to DCV systemic infection by pricking, it better reflects the *Drosophila* way of infection in the field. Also, the resistance allele of *pastrel* was absent in 90% of our stock populations, we thus preferred to let evolve only population that do not carry this mutation, to potentially discover other mechanisms of resistance/tolerance against DCV.

To summarize, this study shows that oral infection by DCV reduced larval and adult survival but did not impact the size of flies nor their density in *Wolbachia* symbionts. *Wolbachia* in turn protected flies that grew on DCV-contaminated food in a stage-specific manner. Flies which ingested DCV-contaminated food for 12 generations exhibited a limited host evolution toward tolerance, only visible in *Wolbachia*-free individuals. These results suggest that natural conditions of contamination do not exert a strong enough selective pressure to maintain or favor *Wolbachia* strains at high density within their host in natural populations.

III.4. Article 3 : Influence du stress oxydatif sur l'association *wMelPop-Drosophila melanogaster* et son implication dans la réponse antivirale de l'association symbiotique

III.4.1 Introduction

Les changements environnementaux actuels sont responsables d'une augmentation du taux d'extinction des espèces qui est 100 à 1000 fois plus élevé que dans les temps géologiques passés (IUCN, 2021). Cette érosion de la biodiversité, que certains qualifient de sixième extinction, est engendrée par la dégradation des habitats, la surexploitation des espèces, l'introduction d'espèces envahissantes, la pollution anthropique et les changements climatiques. La pollution et les changements climatiques produisent souvent une modification de la physiologie des organismes qui impacte leur valeur sélective. La vie en symbiose peut être un facteur qui détermine la réponse des organismes aux perturbations environnementales. D'une part, les symbiotes peuvent limiter les impacts négatifs des perturbations environnementales sur la valeur sélective de leurs hôtes (Clay, 2014; Flórez et al., 2015; Oliver and Moran, 2009). D'autre part, la perturbation de l'équilibre symbiotique par les changements environnementaux peut entraîner une réduction de la valeur sélective des organismes (Baker et al., 2018; Yakovleva et al., 2009).

Un exemple de perturbation environnementale qui peut affecter directement les organismes, ainsi que leur population symbiotique, est la perturbation de la balance oxydative. La pollution engendrée par les activités agricoles ou bien le réchauffement climatique sont des perturbations qui peuvent participer à la déstabilisation de l'homéostasie oxydative des organismes. Ces perturbations écologiques peuvent avoir pour conséquences d'augmenter la quantité de ROS (*Reactive Oxygen Species*) chez les organismes qui y sont soumis. Ces ROS, lorsqu'ils sont en excès dans les tissus des organismes, provoquent une surcharge oxydative qui peut impacter directement les traits d'histoire de vie des organismes. Les espèces réactives de l'oxygène, de par leur nature très réactive avec les molécules du vivant, peuvent par exemple engendrer

une diminution de la valeur sélective des organismes en provoquant des dommages sur leur ADN, en altérant des fonctions physiologiques nécessaires à leur survie ou encore en diminuant leurs capacités de reproduction (Bonilla et al., 2006; Doran et al., 2017; Hosamani and Muralidhara, 2013; Mehdi and Qamar, 2013).

Chez les insectes, les ROS sont aussi impliqués dans la signalisation cellulaire et dans de nombreuses voies immunitaires, qui leur permettent de contrôler à la fois quantitativement et qualitativement les interactions avec les microorganismes susceptibles de les coloniser (Moné et al., 2014). Récemment, l'importance de la balance oxydative a été mise en évidence dans les relations *Wolbachia*-insecte. L'apport exogène de glutathion, une molécule anti-oxydante, engendre une augmentation de la densité en *Wolbachia* dans les tissus des drosophiles *D. simulans* (Brennan et al., 2012), mais pas dans les tissus de *D. melanogaster* (Monnin et al., 2016). A l'inverse, l'apport exogène d'une molécule pro-oxydante, comme le paraquat, provoque une surcharge oxydative dans les tissus des hôtes, qui s'accompagne d'une diminution de la densité en *Wolbachia* (Fallon et al., 2013; Monnin et al., 2016). Cette influence directe qu'exerce la balance oxydative sur la population symbiotique est alors déterminante dans la relation qu'entretiennent les partenaires symbiotiques (May and Anderson, 1979). Par exemple, la souche wMelPop qui présente des coûts physiologiques importants pour les drosophiles comparativement aux autres souches de *Wolbachia* (car elle présente de forts niveaux de densité) perd son pouvoir pathogène en condition de surcharge oxydative (Monnin et al., 2016). La déstabilisation de la balance oxydative peut alors influencer les bénéfices et les coûts pour l'hôte imposés par la présence des symbiotes, et modifier la place de l'association symbiotique sur le continuum mutualisme-parasitisme.

La densité symbiotique est une caractéristique déterminante dans l'expression du phénotype des hôtes. Ainsi des modifications des niveaux de densité de *Wolbachia* chez les drosophiles peuvent conduire à une modification des phénotypes induit par *Wolbachia* chez ses hôtes (Douglas, 2009; Mouton et al., 2007). Une perturbation de la balance oxydative, qui peut être associée à une modulation de la densité symbiotique, pourrait, en plus de modifier les coûts physiologiques imposés par *wMelPop*, intensifier ou limiter les avantages sélectifs que procure *wMelPop* dans un contexte d'infection virale (Brennan et al., 2012). Étant donné que la densité en *wMelPop* est déterminée génétiquement (nombre de copies d'*Octomom*), la protection antivirale (densité-dépendante) médiée par *Wolbachia* corrèle aussi positivement au nombre de copies d'*Octomom* présent dans la population de bactérie qui colonise un hôte (Chrostek et al., 2013, 2014). Or, dans un contexte où la densité symbiotique est réduite artificiellement, cette corrélation positive entre le nombre de copies d'*Octomom* et la densité est susceptible d'être perdue. Une exposition prolongée à un agent pro-oxydant pourrait mener à une augmentation du nombre de copies d'*Octomom* après plusieurs générations, du fait de la relâche de la pression de sélection qui tend à limiter les coûts liés à *Octomom*. Comme cette exposition prolongée pourrait potentiellement entraîner des conséquences sur le nombre de copies d'*Octomom* et sur les traits d'histoire de vie des hôtes, une surcharge oxydative pourrait aussi modifier l'efficacité de la protection antivirale à plus ou moins long terme évolutif. D'une part, une exposition chronique à une surcharge oxydative tendrait à limiter la sélection inter-hôte (par la limitation/disparition des coûts associés à la présence de *wMelPop*) et d'autre part, l'infection virale tendrait, quant à elle, à renforcer la sélection inter-hôte (en favorisant les variants de *wMelPop* qui protègent le mieux). Les conséquences évolutives d'une exposition chronique à ces deux agents stressants en combinaison

restent encore indéterminées sur l'association *wMelPop-D. melanogaster*. L'étude de l'interaction entre ces deux agents stressants est donc nécessaire pour comprendre l'influence d'une surcharge oxydative sur la réponse au DCV et pour identifier l'impact de telles expositions combinées chroniques aux agents stressants sur la coévolution des partenaires symbiotiques.

Dans cette étude, nous avons donc cherché à comprendre – par le biais d'expérimentations – l'influence d'une surcharge oxydative ponctuelle sur la population bactérienne, en quantifiant l'impact de l'apport d'un agent pro-oxydant (le paraquat) dans la nourriture des larves de drosophiles sur la densité et le nombre de copies d'*Octomom* de *wMelPop* chez des drosophiles adultes. Ensuite, nous avons testé si la diminution de densité en *wMelPop* induite par l'agent pro-oxydant influence les effets protecteurs antiviraux de *wMelPop*. Afin de mieux comprendre les conséquences de l'évolution des partenaires symbiotiques sur leur réponse aux agents stressants, nous avons – par une approche d'évolution expérimentale – testé le potentiel évolutif de l'association symbiotique après une exposition chronique aux agents stressants pro-oxydants et viraux. A cette fin, nous avons dans un premier temps mesuré les impacts d'une exposition chronique à l'agent pro-oxydant sur différents traits d'histoire de vie des hôtes et des bactéries, ainsi que l'influence d'une exposition chronique à la combinaison des deux agents stressants sur l'hôte et la population symbiotique. Dans un second temps, nous avons aussi testé si l'évolution sous un régime stressant chronique peut influencer la réponse de l'association lors d'une exposition à un autre agent stressant. Plus particulièrement, nous avons cherché à caractériser les conséquences d'une exposition chronique aux agents stressants lors d'une exposition ponctuelle au DCV après 12 générations d'exposition au paraquat combinée ou non avec une exposition chronique au DCV.

III.4.2 Matériels et méthodes

Les lignées de drosophiles utilisées pour ces expériences, les conditions d'élevage, la production virus, la méthode d'infection orale, les mesures de survie, de taux de développement, de taille des ailes, les méthodes d'extraction d'ADN et d'ARN, la quantification de la densité en wMelPop, du nombre de copies d'Octomom et du virus sont identiques à celles présentées dans le chapitre précédent. Sont listées ci-dessous les spécificités de cette série d'expérience.

Détail sur les mesures réalisées au cours de l'évolution expérimentale.

Pour évaluer l'impact ponctuel de l'agent pro-oxydant et de sa combinaison avec le DCV sur l'association symbiotique, les mesures ont été réalisées sur des individus ayant été exposés au(x) agent(s) stressant(s) pendant tout leur développement larvaire, et transférés sur milieu de culture (sans agent stressant) immédiatement après émergence. Pour l'étude de l'impact d'une exposition chronique aux agents stressants, les mesures ont été réalisées en condition de « relâche » de stress oxydant, c'est-à-dire que les drosophiles qui ont été échantillonnées n'ont pas subi d'exposition au paraquat durant leur développement à la génération de l'échantillonnage. Pour l'étude de l'impact sur la réponse antivirale d'une évolution potentielle de la population bactérienne en réponse à une exposition chronique aux agents stressants, les mesures ont été réalisées en condition de « relâche » de stress oxydant, suivie d'une exposition ponctuelle au DCV durant le développement des drosophiles à la génération de l'échantillonnage.

III.4.3 Résultats

Pour caractériser l'impact de la combinaison d'une surcharge oxydative et du DCV sur la stabilité de l'association symbiotique et sur sa valeur sélective, nous avons caractérisé les réponses de l'association symbiotique à une exposition ponctuelle ou chronique de chacun des agents stressants et de leur combinaison (Voir chapitre 2 pour la réponse à une infection virale seule). En particulier, nous avons mesuré les traits bactériens spécifiques à wMelPop, la charge virale et les différents traits d'histoire de vie des drosophiles tout au long de l'expérience.

III. Influence d'une exposition ponctuelle aux agents stressants pro-oxydants et viraux sur l'association wMelPop-Drosophila melanogaster.

Comme les différents traits bactériens sont impliqués dans l'expression du phénotype des hôtes, nous avons tout d'abord évalué l'impact des différents agents stressants (seuls ou combinés) sur la population bactérienne. Nous avons mesuré la densité relative en wMelPop et le nombre de copies d'Octomom moyen par bactérie par mouche chez des drosophiles âgées de 3 jours ayant été exposées ou non aux agents stressants durant leur développement larvaire.

1.1. Influence d'une exposition ponctuelle aux agents stressants pro-oxydants et viraux sur les populations bactériennes et virales

a. Le DCV n'influence pas les traits bactériens.

Au cours des expériences précédentes concernant l'influence du DCV sur les traits de wMelPop (chapitre 2, figure 2A et 2B ci-dessous (figurés verts)), nous avons montré que l'infection virale n'a d'influence significative ni sur la densité relative en

Wolbachia, ni sur la diversité génétique de la population symbiotique au niveau du nombre de copies d'Octomom.

b. L'exposition ponctuelle à un agent pro-oxydant réduit la densité en wMelPop mais n'influence pas le nombre de copies d'Octomom.

Pour déterminer l'influence d'une surcharge oxydative sur la population bactérienne, nous avons mesuré la densité relative en wMelPop et le nombre moyen de copies d'Octomom par bactérie par drosophile chez des individus émergents ayant été exposés au paraquat durant leur développement (Figures 2A et 2B).

Au cours de nos mesures, nous avons identifié que la densité bactérienne relative a diminué de manière significative en réponse à l'exposition au paraquat (densité 1,7 fois plus faible que dans la condition contrôle) (figure 2A ; GLMM ; Densité ~ *paraquat* : $P = 0,005$). Concernant le nombre moyen de copies d'Octomom, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les mouches témoins et celles exposées au paraquat. De plus, nous avons observé que la corrélation positive entre la densité et le nombre de copies d'Octomom n'est pas retrouvée en présence de paraquat (figure 2C ; ML ; densité ~ *Octomom* * *paraquat* : $P > 0,1$). Ces résultats semblent indiquer que la diminution de densité induite par une surcharge oxydative ne modifie pas la diversité de wMelPop observée au sein de ses hôtes, et qu'elle n'est donc pas issue de la sélection de certains variants au sein de la population bactérienne.

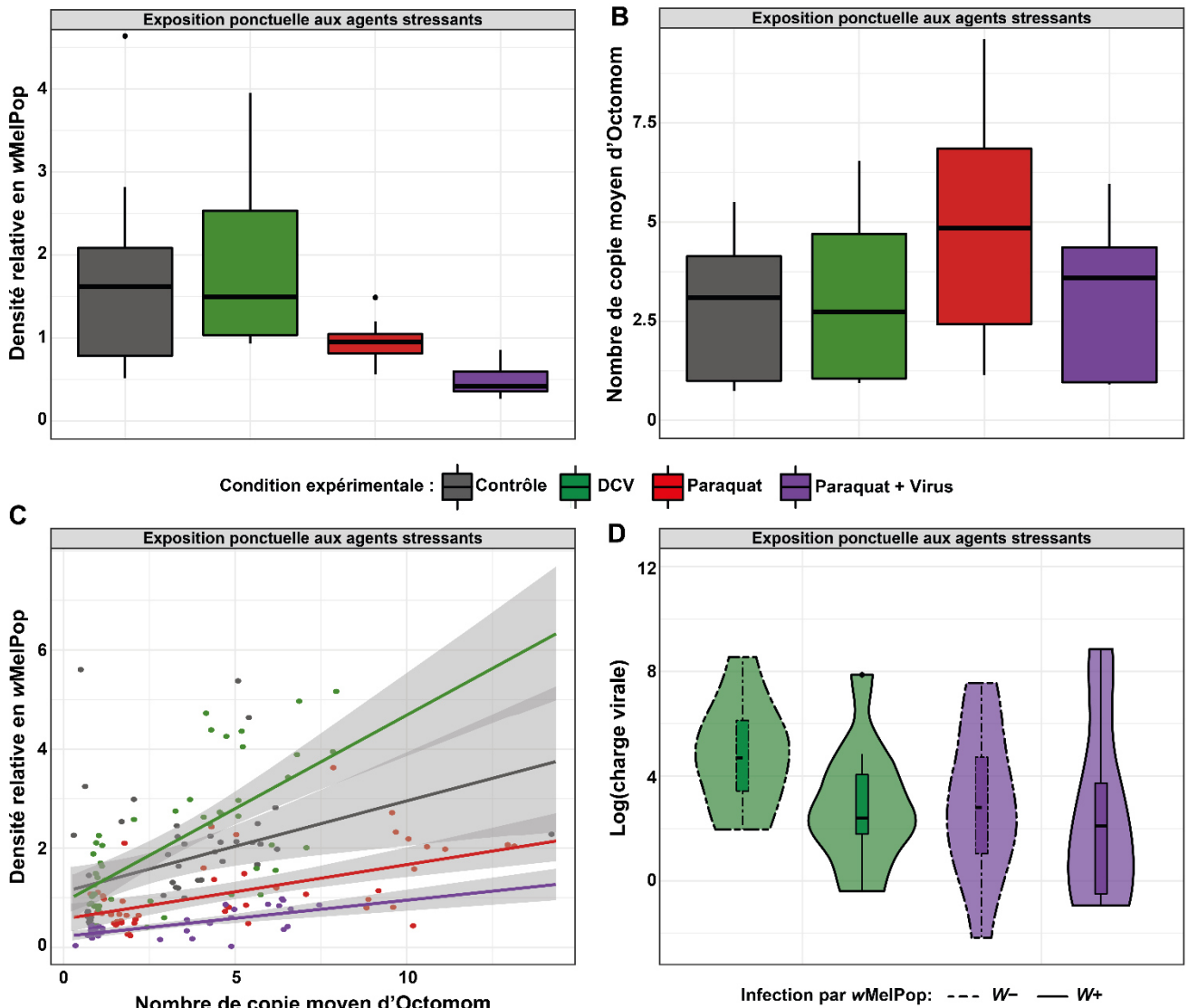


Figure 2 : Effet de l'exposition ponctuelle à différents agents stressants sur la densité relative, le nombre de copies d'Octomom et sur la charge virale.

Densité relative en *wMelPop* (**2A**), nombre moyen de copies d'Octomom par bactérie (**2B**), relation entre la densité relative en *wMelPop* et le nombre de copies d'Octomom (**2C**), et charge virale (**2D**) après exposition ponctuelle aux différents agents stressants lors du développement larvaire (n = 5 individus / 10 lignées répliques / condition).

La couleur grise représente la condition contrôle où les drosophiles se sont développées en absence d'exposition aux agents stressants. La couleur verte représente la condition où les drosophiles se sont développées en présence de DCV pendant le développement larvaire. La couleur rouge représente la condition où les drosophiles se sont développées dans un milieu nutritif contenant du paraquat, un agent pro-oxydant, pendant leur développement larvaire. La couleur mauve représente la condition où les drosophiles se sont développées en condition de combinaison des agents stressants (paraquat + virus) pendant le développement larvaire.

c. L'exposition ponctuelle à la combinaison des agents stressants diminue plus fortement la densité symbiotique qu'en condition de stress oxydant seul.

Nous avons ensuite quantifié la densité relative en *wMelPop* (Figure 2A) ainsi que le nombre moyen de copies d'Octomom par bactérie par mouche (Figure 2B) chez

des individus ayant été exposés à la combinaison des agents stressants pro-oxydant et viral lors de leur développement.

Nous avons constaté une diminution significative de la densité relative en *wMelPop* chez les individus soumis à la combinaison de stress par rapport aux témoins (figure 2A ; GLMM ; Densité \sim *paraquat* * *DCV* : $P < 0,001$). Cette diminution est près de 2 fois plus importante que celle observée lors d'un stress oxydatif seul (test de comparaison multiple : *paraquat* vs *paraquat+DCV* : $P < 0,001$). Comme pour l'influence d'une exposition ponctuelle au paraquat ou au virus, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les mouches témoins et celles exposées à la combinaison d'agent stressants concernant le nombre moyen de copies d'*Octomom* par bactérie par mouche (figure 2B ; MLM ; Copies d'*Octomom* \sim *paraquat* * *DCV* : $P > 0,1$). De plus, nous avons observé que la corrélation positive entre la densité et le nombre de copies d'*Octomom* n'est pas non plus retrouvée lors de la combinaison des agents stressants (figure 2C ; LM ; densité \sim *Octomom* * *paraquat+DCV* : $P > 0,1$).

Ces résultats nous indiquent que la diminution de la densité relative en *wMelPop* induite par une surcharge oxydative est amplifiée lorsque les individus sont aussi exposés à un agent stressant viral. Cette diminution de densité relative induite par les agents stressants ne s'accompagne pas d'un changement de diversité génétique au sein de la population bactérienne.

d. L'exposition à l'agent pro-oxydant modifie la réponse de l'association symbiotique au stress viral.

Nous avons mis en évidence dans le chapitre précédent que la présence de *wMelPop* induit un blocage de la réplication virale caractérisé par une diminution de la charge virale chez les individus porteurs de *Wolbachia* (Figure 2D, figurés verts).

En présence de paraquat, *wMelPop* ne semble plus bloquer aussi efficacement la réplication du DCV. En effet, la charge virale des individus colonisés ou non par *wMelPop* exposés à une surcharge oxydative ne diffère pas de celle des individus sensibles à l'infection virale (non colonisés par *Wolbachia*) (Figure 2D ; MLM ; Charge virale \sim paraquat / paraquat**wMelPop* : $P > 0,1$). Cependant, l'analyse détaillée des charge virales en condition de stress oxydatif indique que la médiane de la charge virale des individus exposés à une surcharge oxydative (colonisés ou non par *wMelPop*) est similaire à celle quantifiée lors du blocage de la réplication virale par *wMelPop* en absence de paraquat, mais que la variance associée à la charge virale est plus grande après exposition à une surcharge oxydative (DCV sans *wMelpop* = 4.70 ± 0.81 ; DCV avec *wMelpop* = 2.39 ± 0.88 ; paraquat+ DCV sans *wMelpop* = 2.81 ± 1.15 ; paraquat+ DCV avec *wMelpop* = 2.10 ± 1.39).

Ces résultats montrent qu'une surcharge oxydative annule le blocage de la réplication virale médié par *wMelpop*. En revanche, ces résultats suggèrent aussi que le stress oxydatif amplifie la variabilité de réponse de l'association à l'infection virale.

1.2. Influence d'une exposition ponctuelle aux agents stressants pro-oxydants et viraux sur les traits de vie de l'hôte

Les résultats précédents montrent une influence du paraquat sur l'abondance relative en *wMelPop* et sur sa capacité à limiter la prolifération du DCV chez les drosophiles. Nous avons donc voulu tester si les conséquences de tels changements sur la population symbiotique se traduisent aussi par des changements phénotypiques chez les hôtes. Nous avons alors mesuré l'influence d'une exposition ponctuelle aux agents stressants pendant le stade larvaire sur divers traits d'histoire de vie des hôtes,

tels que le taux d'émergence (figure 3A), la taille des ailes (figure 3B), et la survie des drosophiles (figure 3C et D).

Comme évoqué précédemment, à des fins de caractériser les influences respectives de chacun des agents stressants sur l'association symbiotique, nous avons d'abord évalué l'influence d'une infection virale et d'une surcharge oxydative indépendamment puis en combinaison.

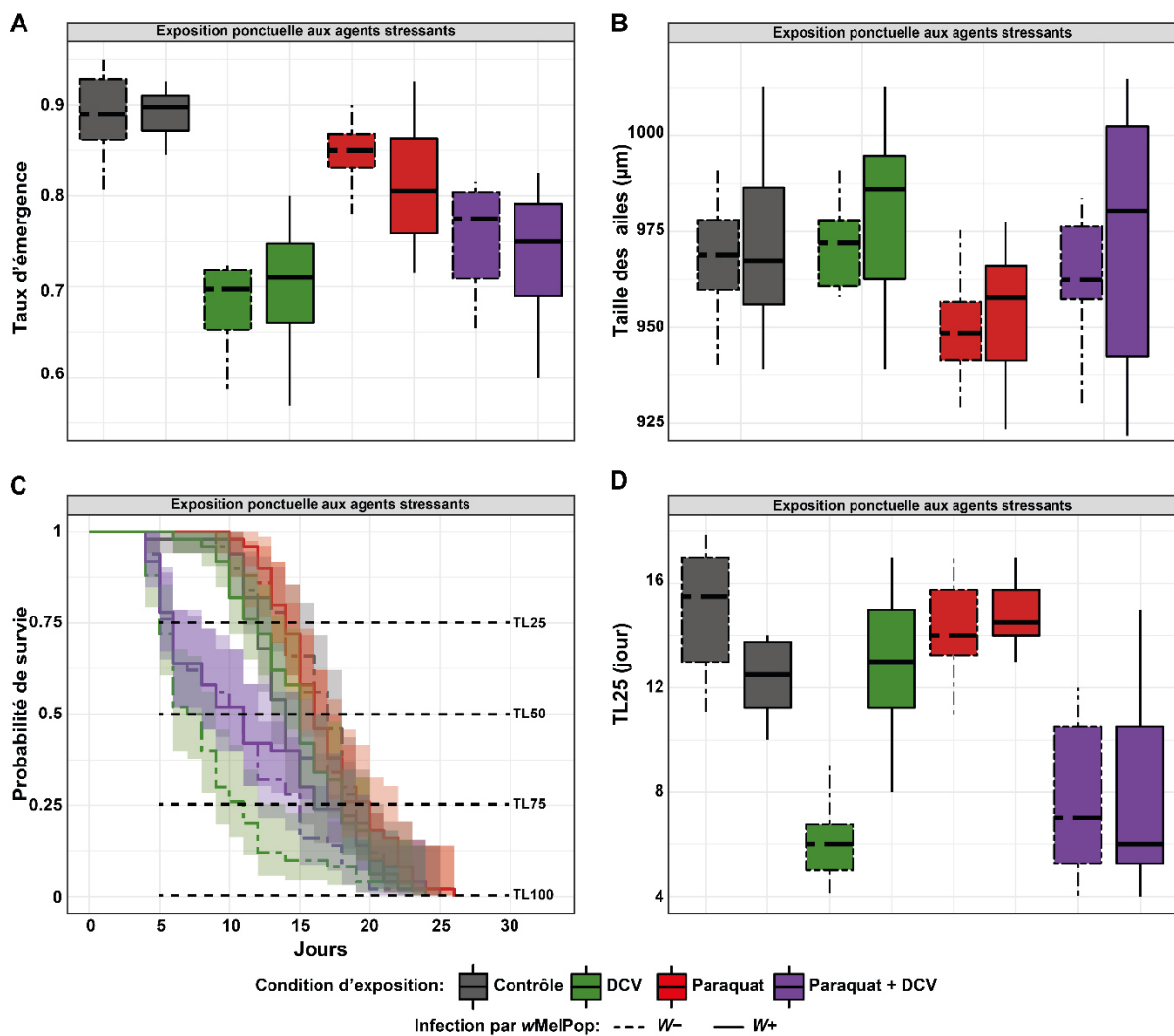


Figure 3 : Effet de l'exposition ponctuelle à différents agents stressants sur les différents traits d'histoire de vie des hôtes.

Taux d'émergence (**3A**) (n = 10 lignées répliquas / condition), taille des ailes (**3B**), et survie adulte (**3C et D**) après exposition ponctuelle aux différents agents stressants lors du développement larvaire (n = 5 individus / 10 lignées répliquas / condition).

La couleur grise représente la condition contrôle où les drosophiles se sont développées en absence d'exposition aux agents stressants. La couleur verte représente la condition où les drosophiles se sont développées en présence de DCV pendant le développement larvaire. La couleur rouge représente la condition où les drosophiles se sont développées dans un milieu nutritif contenant du paraquat, un agent pro-oxydant, pendant leur développement larvaire. La couleur mauve représente la condition où les drosophiles se sont développées en condition de combinaison des agents stressants (paraquat + virus) pendant le développement larvaire.

A. La protection antivirale de wMelPop dépend du stade de développement de l'hôte.

Au cours des expériences présentées dans le chapitre précédent concernant l'influence du DCV sur les traits d'histoire de vie des hôtes, nous avons pu identifier que l'ingestion de DCV entraîne des conséquences négatives significatives sur la survie des larves et des adultes, mais aucun effet sur la taille des mouches. Ces résultats ont également mis en évidence que wMelPop protège efficacement son hôte après l'ingestion du DCV en termes de survie adulte, mais pas de réussite du développement larvaire.

b. L'exposition ponctuelle à un agent pro-oxydant influence peu les traits d'histoire de vie des hôtes.

Nos expériences ont révélé qu'une exposition ponctuelle à l'agent pro-oxydant n'influence que très faiblement les traits d'histoire de vie des hôtes. En effet, quel que soit le statut de colonisation par wMelPop, les mesures réalisées en condition de surcharge oxydative pour le taux d'émergence et la survie des hôtes n'ont pas révélé de différence significative avec le témoin n'ayant pas subi d'exposition à l'agent pro-oxydant (figure 3A, C&D ; MLM ; émergence/survie ~ *paraquat* : $P > 0,1$).

La taille des ailes des lignées de drosophiles ayant subi une exposition ponctuelle à l'agent pro-oxydant est réduite par rapport aux drosophiles de la condition contrôle (figure 3B ; MLM ; Taille des ailes \sim *paraquat* : $P = 0,002$). En revanche, le statut de colonisation par *wMelPop* n'influence pas cette réduction de taille des ailes. De plus, cette réduction de taille des ailes provoquées par une exposition au paraquat est plutôt faible ($-26 \mu\text{m}$ ($\sim -2,7\%$) par rapport à la condition contrôle).

Ces résultats suggèrent que les doses auxquelles ont été exposés les individus n'impactent pas significativement le phénotype des drosophiles.

c. Les effets de la surcharge oxydative sur la réponse antivirale de l'association dépendent du stade développement des hôtes.

Nous avons identifié qu'une surcharge oxydative combinée à un stress viral entraîne une réponse de l'association symbiotique différente de celle après exposition à un seul type d'agent stressant. En effet, l'exposition à une combinaison des agents stressants impacte négativement le taux d'émergence des drosophiles (Figure 3A ; MLM ; Taux d'émergence \sim *paraquat* * *DCV* : $P < 0,05$), contrairement aux effets de l'exposition au paraquat seul (test de comparaison multiple ; *paraquat* **vs** *paraquat+DCV* : $P < 0,001$). En revanche, la surcharge oxydative semble limiter les effets négatifs de l'infection virale sur le taux d'émergence (test de comparaison multiple ; *DCV* **vs** *paraquat+DCV* : $P < 0,05$).

Au stade adulte, nous avons aussi constaté qu'une exposition au paraquat limite les effets protecteurs de *wMelPop* contre l'infection virale quelques jours après l'émergence des drosophiles, mais qu'elle semble aussi réduire l'effet pathogène du virus 15 jours après l'émergence. En effet, la protection médiée par *wMelPop* varie en

fonction de l'âge des drosophiles : les TL25 (temps léthal ou 25% des individus de la cohorte sont morts) des individus exposés à la combinaison des agents stressants diffèrent significativement des témoins indifféremment du statut de colonisation par *Wolbachia* (Figure 3C&D ; MLM ; $TL25 \sim \text{paraquat} * DCV : P < 0,05$). Ensuite, l'effet protecteur de *wMelPop* est retrouvé au temps léthal 50 (Figure 3C&D ; MLM ; $TL50 \sim \text{paraquat} * DCV * wMelPop : P < 0,05$). Lorsque les drosophiles sont plus âgées, la surcharge oxydative limite l'effet pathogène du virus (Figure 3C&D ; MLM ; $TL75/TL100 \sim \text{paraquat} * DCV : P > 0,1$).

Nous avons aussi identifié que la combinaison des agents stressants ne diminuait pas significativement la taille des ailes des individus exposés (infectés ou non par *wMelPop*) (Figure 2A ; MLM ; Taille des ailes $\sim \text{paraquat} * DCV : P > 0,1$), contrairement à ce que nous avons observé chez les individus exposés seulement au paraquat (Figure 2A ; MLM ; Taille des ailes $\sim \text{paraquat} : P = 0,002$).

En résumé, bien qu'une surcharge oxydative diminue la densité bactérienne sans impacter sa composition, cette diminution de densité suffit pour impacter négativement le phénotype des hôtes dans un contexte d'infection virale. Les effets antiviraux médiés par *wMelPop* sont réduits sous l'influence du paraquat, ce qui diminue l'efficacité du blocage de la réplication virale et l'efficacité de la protection antivirale. En revanche, ces résultats montrent aussi un effet protecteur du paraquat contre l'infection virale au stade larvaire, ce qui suggère des effets antagonistes du paraquat sur la réponse à l'infection virale, qui dépendent du stade de développement de l'hôte.

2. Influence de l'exposition chronique aux agents stressants pro-oxydant et viraux sur l'association *wMelPop*-drosophile.

Pour déterminer les conséquences d'une exposition chronique aux agents stressants sur l'association symbiotique, nous avons effectué les mêmes mesures de densité relative et de copies d'Octomom (figure 4) et sur les le taux d'émergence, la taille des ailes et la survie des drosophiles (figure 5) après 12 générations d'exposition aux différents agents stressants. Ces mesures ont été réalisées en condition de relâche de stress, c'est-à-dire, en absence d'exposition aux agents stressants à la génération de la mesure (voir figure 1).

A. L'exposition chronique à un agent pro-oxydant n'influence pas l'évolution de la population bactérienne, qu'il soit seul ou en combinaison avec le DCV.

Les agents stressants affectent différemment la population symbiotique lors d'une exposition ponctuelle. En effet, la densité en *wMelPop* n'est pas influencée par l'infection virale tandis qu'elle est réduite lors d'une exposition ponctuelle au paraquat, combinée ou non avec le virus. Bien que la diversité génétique de la population bactérienne ne semble pas impactée par les différents agents stressants lors d'une exposition ponctuelle, il est possible que la pression de sélection de l'exposition chronique à ces derniers puisse favoriser certains variants bactériens. Nous avons donc analysé les traits bactériens après 12 générations dans des conditions de relâche de stress.

L'exposition chronique à une surcharge oxydative combinée ou non avec le DCV n'affecte pas la population symbiotique. En effet, ni la densité relative en *wMelPop*, ni le nombre de copie moyen d'Octomom des individus issus d'une évolution en condition d'infection virale, de surcharge oxydative ou bien de la combinaison des agent stressants ne présentent de différence significative avec les lignées ayant

évolué en condition contrôle (Figure 3A&B ; GLMM ; Densité/Octomom ~ conditions d'évolution : $P > 0,1$). De plus, en comparant les mesures en présence de paraquat sur les lignées ayant évoluées en condition d'exposition chronique (voir Figure 1 lignée rouge G1 à G13) aux mesures en présence de paraquat sur des lignées contrôles n'ayant jamais rencontré cet agent stressant (voir Figure 1 lignées noires G1 à G1') nous constatons que les traits bactériens (densité et nombre de copies d'Octomom) ne sont pas significativement différents (GLMM ; Densité/Octomom ~ conditions d'évolution : $P > 0,1$). Ces résultats suggèrent que la densité en wMelPop reste inchangée après une exposition chronique au paraquat ou à la combinaison des agents stressants comparativement à une exposition ponctuelle.

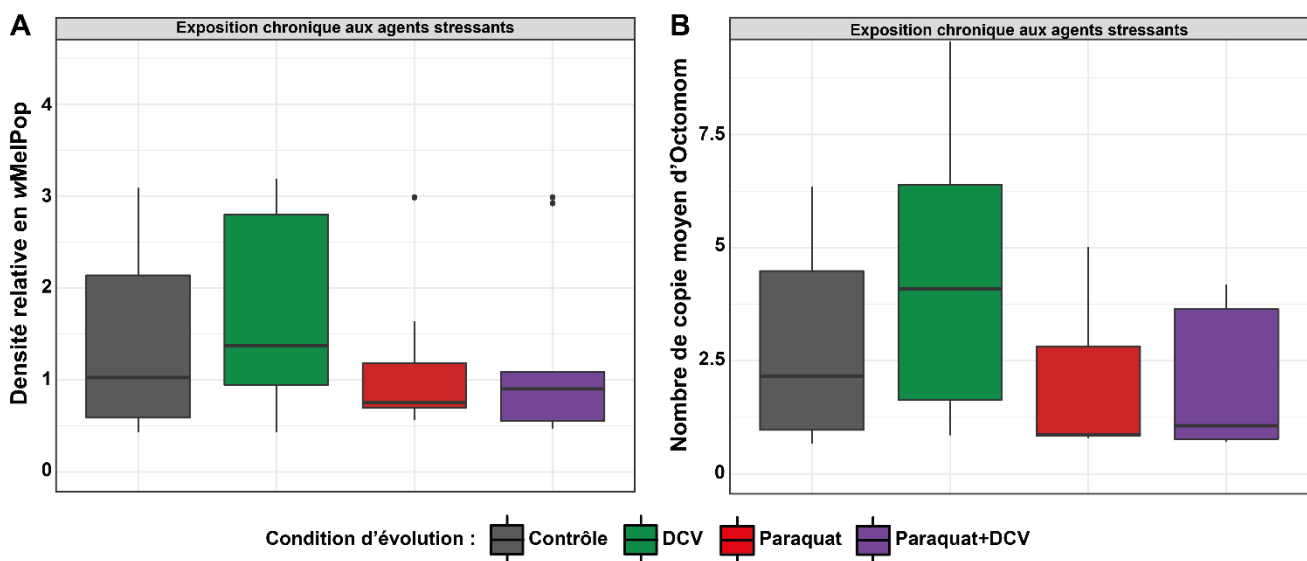


Figure 4 : Influence d'une exposition chronique aux agents stressants sur la densité et le nombre de copies d'Octomom.

Toutes les mesures ont été réalisées en absence d'exposition aux agents stressants à la génération de la mesure. Densité relative en wMelPop (**4A**), nombre moyen de copies d'Octomom par bactérie (**4B**) en condition de relâche de stress, après 12 génération d'exposition chronique aux différents agents stressants (n = 5 individus / 10 lignées répliques / condition).

La couleur grise représente la condition d'évolution contrôle où les drosophiles se sont développées en absence d'exposition aux agents stressants pendant 12 générations. La couleur verte représente la condition d'évolution où les drosophiles ont été exposées au DCV pendant 12 générations. La couleur rouge représente la condition d'évolution où les drosophiles ont été exposées au paraquat pendant 12 générations. La couleur mauve représente la condition d'évolution où les drosophiles ont été exposées à la combinaison des agents stressants pendant 12 générations.

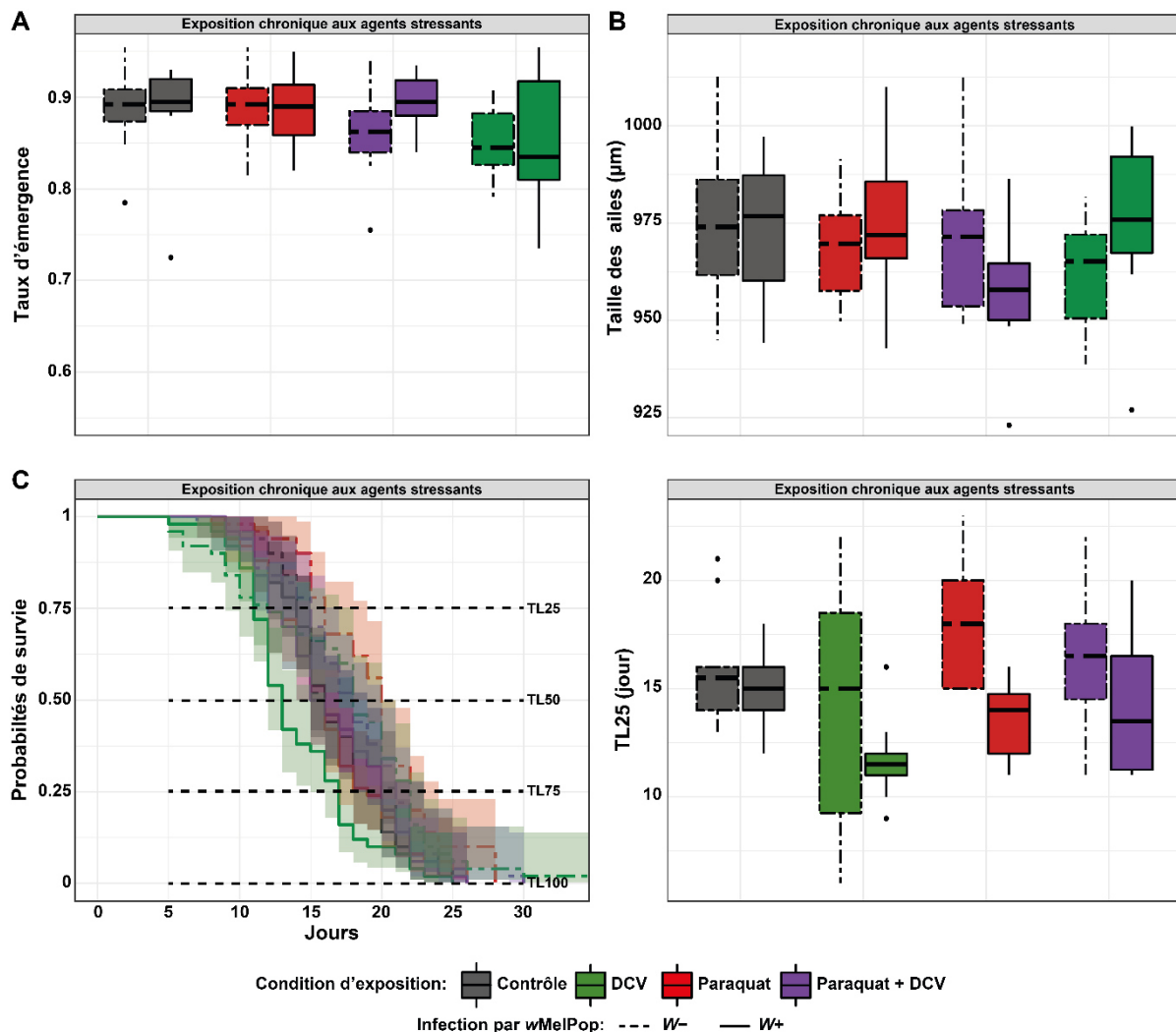
b. L'exposition chronique à un agent pro-oxydant n'a pas de conséquence sur les traits d'histoire de vie des hôtes, qu'il soit seul ou en combinaison avec le DCV.

Nous avons aussi mesuré, en condition de relâche de stress, les différents traits d'histoire de vie chez les drosophiles issues de lignées ayant été exposées aux différents agents stressants pendant 12 générations.

Nos précédents résultats (chapitre 2) concernant les impacts d'une infection chronique au DCV ont montré que les partenaires de l'association ne se sont pas adaptés à l'infection virale chronique après 12 générations d'exposition au DCV. En effet, ni les hôtes exempts de *Wolbachia* ni les hôtes colonisés par *wMelPop* exposés chroniquement au DCV ne présentaient de différence significative avec leurs témoins respectifs.

Au cours de l'étude présentée ici, tout comme pour l'exposition chronique au DCV, nous n'avons pas identifié d'impact significatif d'une exposition chronique au paraquat ou bien à la combinaison des deux agents stressants sur chacun des traits d'histoire de vie des hôtes mesurés après relâche des stress. En effet, les mesures de taux d'émergence, de survie des individus adultes, ou encore de la taille des ailes effectuées sur des individus exposés chroniquement aux différentes modalités de stress ne diffèrent pas significativement des mesures réalisées sur des individus issus de lignées ayant évolué en condition contrôle pendant 12 générations (Figure 5 ; MLM ; Traits d'histoire de vie ~ conditions d'évolution : $P > 0,1$). De plus, la présence de *wMelPop* n'affecte pas non plus l'évolution des traits d'histoire de vie des hôtes exposés de façon chronique aux différents agents stressants (Figure 5 ; MLM ; Traits d'histoire de vie ~ conditions d'évolution**wMelPop* : $P > 0,1$).

Pris dans leur ensemble, ces résultats concernant l'évolution des traits bactériens et des traits d'histoire de vie des hôtes nous indiquent que l'exposition



chronique aux différents agents stressants et à leur combinaison n'influence pas les partenaires de l'association symbiotique après 12 générations d'exposition, lorsque les individus retrouvent des conditions non stressantes.

Figure 5 : Influence d'une exposition chronique aux agents stressants sur les traits d'histoire de vie des hôtes.

Toutes les mesures ont été réalisées en absence d'exposition aux agents stressants à la génération de la mesure. Taux d'émergence (5A ; n = 10 lignées réplias / condition), taille des ailes (5B) et survie adulte (4C et D) en condition de relâche de stress après 12 générations d'exposition chronique aux différents agents stressants (n = 5 individus / 10 lignées réplias / condition).

La couleur grise représente la condition d'évolution contrôle où les drosophiles se sont développées en absence d'exposition aux agents stressants pendant 12 générations. La couleur verte représente la condition d'évolution où les drosophiles ont été exposées au DCV pendant 12 générations. La couleur rouge représente la condition d'évolution où les drosophiles ont été exposées au paraquat pendant 12 générations. La couleur mauve représente la condition d'évolution où les drosophiles ont été exposées à la combinaison des agents stressants pendant 12 générations.

3. Influence de l'exposition chronique aux agents stressants pro-oxydant et viraux sur la réponse de l'association wMelPop-drosophile à l'infection virale.

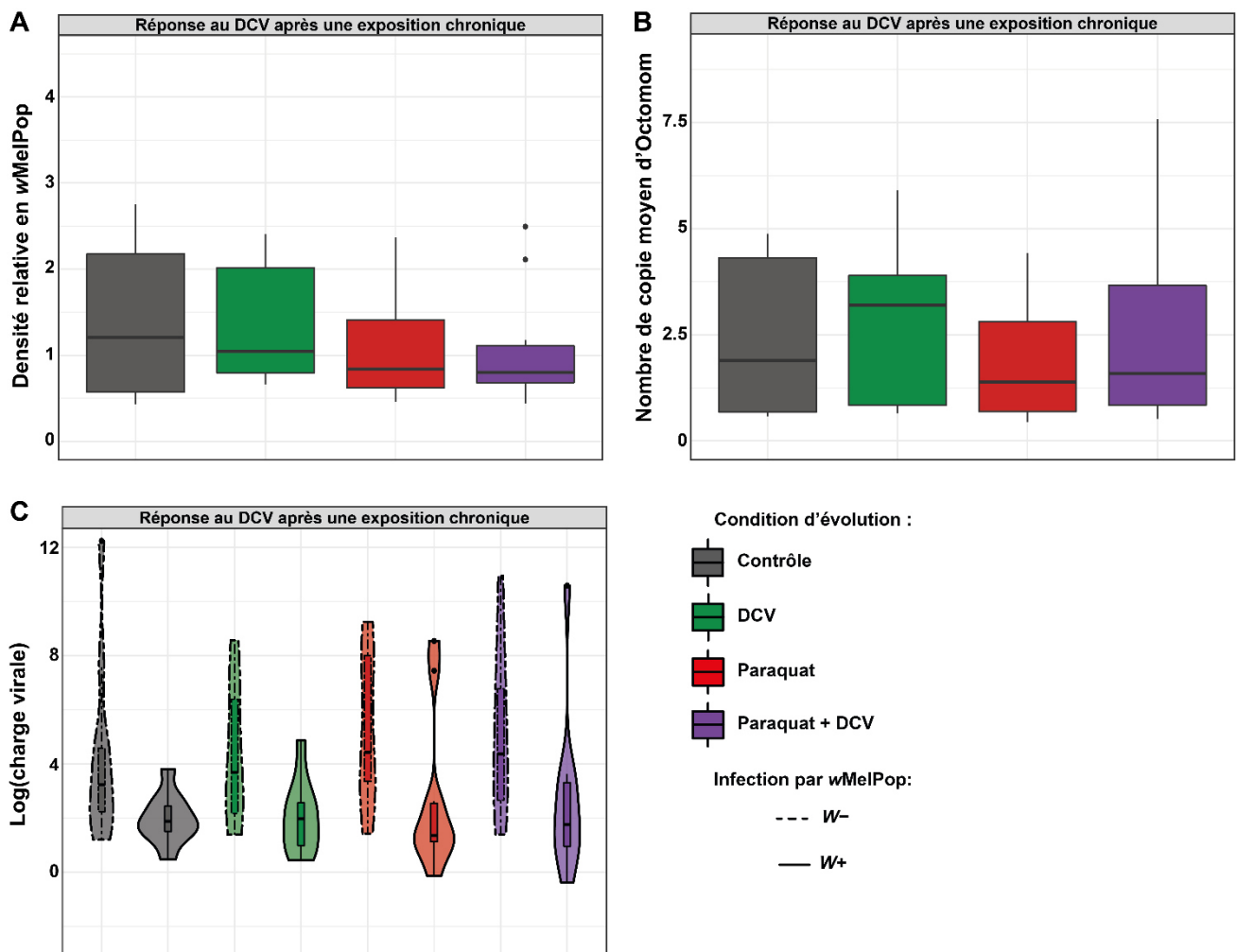
La réduction de densité en wMelPop induite par une exposition au paraquat combinée à une infection par DCV et la diminution du blocage de la réplication virale et de la protection antivirale en présence de stress oxydatif nous laissent supposer que la réponse antivirale peut évoluer lorsque l'association symbiotique se retrouve confrontée à une exposition chronique à ces deux agents stressants. En effet, à la vue des résultats des expositions ponctuelles, nous pouvions nous attendre à ce que la population symbiotique, et par conséquent les traits d'histoire de vie des hôtes, soient modifiés après une évolution en condition d'exposition chronique à la combinaison des agents stressants. C'est pourquoi nous avons testé si la réponse antivirale de la part de la population symbiotique et celle des hôtes ont été modifiées après une exposition chronique à la combinaison des agents stressants.

Pour déterminer les conséquences d'une exposition chronique aux agents stressants sur la réponse antivirale de l'association, nous avons alors effectué des mesures de densité relative en wMelPop, du nombre de copie d'Octomom, de la charge virale (figure 6) et de traits d'histoire de vie des drosophiles (figure 7) après 12 générations d'exposition aux différents agents stressants, et sur des individus soumis à une infection virale lors du développement des individus à la génération d'échantillonnage, mais en condition de relâche de stress oxydatif.

A. L'évolution en condition d'exposition chronique aux agents stressants n'influence pas la réponse de la population bactérienne à l'infection virale.

Tout comme pour les individus ayant évolué seulement en condition virale pendant 12 générations, les individus exposés au DCV après 12 générations d'évolution en condition de stress oxydatif seulement, ou bien à la combinaison des deux agents stressants, ne présentent pas de variations de densité relative ou de nombre moyen de copies d'Octomom avec la condition d'évolution contrôlée exposée ponctuellement au DCV (Figure 6A&B ; GLMM ; Densité/Octomom ~ conditions d'évolution : $P > 0,1$).

Par ailleurs, l'évolution en condition de surcharge oxydative combinée ou non avec l'infection virale n'impacte pas la charge virale des individus exposés au DCV après 12 générations d'exposition chronique. En effet, nous retrouvons un effet global de réduction de la charge virale lié à la présence de wMelPop (Figure 6C ; MLM ;



Charge virale $\sim wMelPop$: $P = 0,009$) mais aucune influence de la condition d'évolution stressante (Figure 6C ; MLM ; Charge virale \sim conditions d'évolution : $P > 0,1$) sur la charge virale.

Figure 6 : Influence d'une exposition chronique aux agents stressants sur la réponse de la population symbiotique au stress viral.

Densité relative en $wMelPop$ (6A), nombre moyen de copies d'Octomom par bactérie (6B) et charge virale (6C), après évolution pendant 12 générations de stress, et directement après une exposition au DCV (n = 5 individus / 10 lignées répliqués / condition).

La couleur grise représente la condition d'évolution contrôle où les drosophiles se sont développées en absence d'exposition aux agents stressants pendant 12 générations puis sont testées lors d'une exposition ponctuelle au DCV lors du développement, à la génération de la mesure. Les couleurs verte, rouge et mauve représentent les conditions d'évolution où les drosophiles se sont développées en étant respectivement exposées au DCV, au paraquat ou à la combinaison paraquat + DCV pendant 12 générations, puis testées lors d'une exposition ponctuelle au DCV lors du développement, à la génération de la mesure.

b. L'évolution en condition d'exposition chronique aux agents stressants n'influence pas la réponse de l'association symbiotique à l'infection virale.

En analysant les différents traits d'histoire de vie des hôtes ayant été exposés chroniquement au paraquat ou à la combinaison des agents stressants, nous avons identifié qu'une évolution en condition de stress oxydatif peut modifier la réponse antivirale sur certains traits d'histoire de vie.

En effet, nous avons identifié que l'évolution en condition de stress oxydatif tend à diminuer très légèrement ($-0,08 \pm 0,03$) la survie larvaire des individus exposés au DCV (Figure 7A ; MLM ; Taux d'émergence \sim paraquat : $P = 0,002$). En revanche, cet effet n'a pas été mis en évidence chez les individus ayant évolué en condition combinaison d'agents stressants, qui ne présentent aucune différence avec les individus de la condition contrôle exposée ponctuellement au DCV (Figure 7A ; MLM ; Taux d'émergence \sim paraquat*DCV : $P > 0,1$).

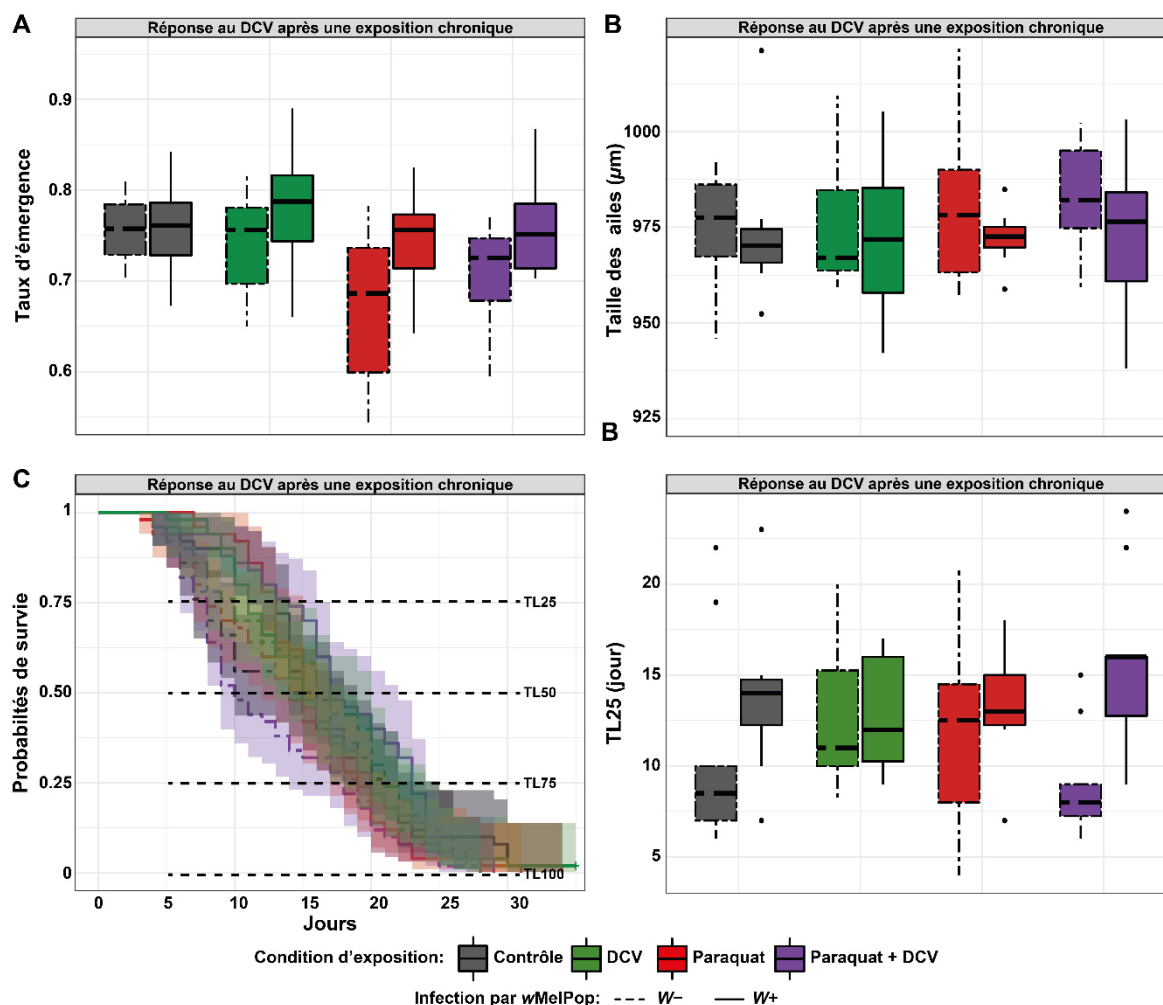


Figure 7 : Influence d'une exposition chronique aux agents stressants sur les traits d'histoire de vie des hôtes en réponse au stress viral.

Taux d'émergence (7A ; n = 10 lignées répliquas / condition), taille des ailes (7B) et survie des drosophiles (7C et D) après évolution pendant 12 générations de stress, et directement après une exposition au DCV (n = 5 individus / 10 lignées répliquas / condition).

La couleur grise représente la condition d'évolution contrôlée où les drosophiles se sont développées en absence d'exposition aux agents stressants pendant 12 générations puis sont testées lors d'une exposition ponctuelle au DCV lors du développement, à la génération de la mesure. Les couleurs verte, rouge et mauve représentent les conditions d'évolution où les drosophiles se sont développées en étant respectivement exposées au DCV, au paraquat ou à la combinaison paraquat + DCV pendant 12 générations, puis testées lors d'une exposition ponctuelle au DCV lors du développement, à la génération de la mesure.

L'exposition ponctuelle au DCV après une évolution dans les différentes conditions stressantes n'a pas révélé d'influence significative des conditions d'évolution ou de la présence de *wMelPop* sur la taille des ailes (Figure 7B ; MLM ; Taille des ailes ~ conditions d'évolution : $P > 0,1$).

Concernant la survie adulte, nous retrouvons l'effet protecteur de *wMelPop* pour chacune des conditions d'évolution (Figure 7C&D ; MLM ; TL25 ~ *wMelPop* : $P = 0,04$)

mais aucune influence des conditions d'évolutions (Figure 7C&D ; MLM ; Survie ~ conditions d'évolution : $P > 0,1$). En revanche, l'évolution en conditions stressantes n'a pas modifié l'influence de *wMelPop* sur la survie (Figure 7C&D ; MLM ; Survie ~ conditions d'évolution* *wMelPop* : $P > 0,1$). Cependant, nous constatons que l'évolution en condition virale et en condition de surcharge oxydative a une tendance non significative à augmenter la survie médiane des drosophiles non colonisées par *wMelPop*. La plus forte variabilité des TL25 observée dans ces conditions nous renseigne d'une modification partielle de la réponse antivirale dans les populations soumises à ces conditions d'évolution.

Ces résultats nous indiquent une faible influence des conditions d'évolution sur les traits d'histoire de vie des drosophiles. Bien que nous ayons identifié une plus grande variabilité dans la réponse des populations non colonisées par *wMelPop* exposées aux stress oxydatifs et à l'infection virale, nous n'avons pas identifié d'effet significatif de ces conditions d'exposition chronique sur chacun des traits d'histoire de vie des drosophiles non colonisées par *Wolbachia*. Nous n'avons pas non plus révélé d'amélioration de la protection antivirale médiée par *wMelPop* après 12 générations d'exposition chronique aux différents agents stressants et à leur combinaison.

Prises dans leur ensemble, ces expériences mettent en évidence des effets négatifs de stress ponctuels oxydants et viraux (seuls ou en combinaison) sur l'association *wMelPop*-drosophile. Cependant, 12 générations d'exposition chronique à ces stress n'induisent pas de changements significatifs au niveau de la population bactérienne ou des traits d'histoire de vie des hôtes, que ces traits soient mesurés dans un contexte neutre ou de stress viral.

III.4.4 Discussion

La réponse des organismes aux perturbations environnementales dépend de différents facteurs incluant les caractéristiques des agents stressants (nature des agents, occurrence et intensité) mais aussi leur capacité à résister ou tolérer ces perturbations (Bénard et al., 2020). Ces mécanismes de résistance ou de tolérance reposent bien souvent sur des bases génétiques propres aux organismes (Mayr, 1982), mais peuvent aussi être induits par les symbiotes qui vivent en interaction avec ces organismes (Douglas, 2015; Sudakaran et al., 2017; Wernegreen and Wheeler, 2009). Les pressions de sélection exercées par les contraintes environnementales qui favorisent ces phénotypes résistants (phénotype insensible) sont susceptibles de fixer certains allèles de résistance dans les populations d'organismes soumis (Mayr, 1982; Salamin et al., 2010). Dans ce contexte d'adaptation, la perturbation de la balance oxydative des drosophiles par des polluants pro-oxydants peut conduire à la sélection de génotypes résistants directement induits par des mutations au sein des populations exposées. Par exemple, l'insertion de l'élément transposable *Bari-Jheh* en amont des gènes *Jheh* (*juvenile hormone epoxide hydrolase*) limite les effets négatifs d'une surcharge oxydative chez *D. melanogaster*. Cette insertion intergénique, qui a un impact fonctionnel bénéfique, participe alors à la réponse adaptative des drosophiles, et sa fréquence augmente dans les populations de drosophiles soumises à une surcharge oxydative prolongée (Guio et al., 2014). L'observation des traces de sélection liées au stress oxydatif dans la nature en fait un agent stressant pertinent à étudier pour comprendre les impacts directs des agents stressants sur les hôtes, les symbiotes et leurs conséquences indirectes sur les hôtes via leurs impacts sur les symbiotes.

Certaines conséquences d'une exposition à un agent pro-oxydant chez les symbioses *Wolbachia*-drosophile ont déjà été caractérisées. Dans un premier temps, la densité en *Wolbachia* peut être considérablement réduite lors d'une exposition ponctuelle au paraquat. Ensuite, cette réduction de densité peut entraîner une réduction des coûts associés à la présence de la bactérie pour les drosophiles (Monnin et al., 2016), qui peuvent être très élevés en fonction de la température (Min and Benzer, 1997; Monnin et al., 2016). Ainsi, dans notre expérience, nous nous attendions à ce que cette réduction des coûts liés à la densité en *wMelPop* puisse entraîner des conséquences sur la dynamique évolutive de *wMelPop* chez ses hôtes. Comme la densité chez *wMelPop* est en partie déterminée par un caractère génétique héritable (le nombre de copies d'*Octomom*), la réduction des coûts induite par une diminution de la densité aurait pu mener à un relâchement de la pression de sélection inter-hôte (qui tend à limiter la prolifération symbiotique et le nombre de copies d'*Octomom*). En présence d'une pression de sélection inter-hôte limitée qui ne contrebalancerait plus les effets de la pression de sélection intra-hôte, nous nous attendions alors à observer une augmentation du nombre de copies d'*Octomom* et une prolifération accrue des symbiotes en condition de relâche après évolution en contexte pro-oxydant (Bashey, 2015; O'Neill et al., 1997). Or, nous n'avons pas observé d'évolution de la population symbiotique concernant les niveaux de densité et du nombre de copies d'*Octomom*, que ce soit en condition contrôle ou en réponse à une exposition prolongée à un agent pro-oxydant. D'une part, nos conditions d'élevage n'ont pas permis l'expression des coûts associés à la présence de *wMelPop* chez les drosophiles (voir les différents traits d'histoire de vie en condition contrôle), ce qui suggère que la pression de sélection inter-hôte n'a pas été suffisante pour agir sur l'évolution de la population symbiotique dans les conditions contrôle ou de surcharge

oxydative. D'autre part, cette absence de réponse à la sélection chez les symbiotes est plutôt surprenante, le nombre de copies d'Octomom ne serait alors peut-être pas la cible de la sélection intra-hôte sous ces contraintes environnementales. Il pourrait aussi exister un autre mécanisme d'évolution du nombre de copies d'Octomom qui ne serait pas lié à la densité en *wMelPop* qui reste contraint lors d'une exposition au stress oxydatif. Par exemple, l'apparition des mutations pouvant mener à un nombre de copies d'Octomom variable (duplication en tandem) pourrait être contrainte sous l'influence du paraquat, ainsi, dès le retour à un environnement dénué de paraquat le nombre de copies d'Octomom moyen dans la population bactérienne atteindrait de nouveau une proportion similaire à nos observations.

Étant donné que les agents pro-oxydants sont des polluants de l'industrie chimique et agricole fréquemment rencontrés dans la nature par les organismes, ils peuvent interagir avec d'autres agents stressants présents dans l'environnement comme les virus. L'interaction des agents stressants peut alors impacter la valeur sélective des organismes et la relation des partenaires symbiotiques autrement qu'une exposition ponctuelle à un agent stressant unique (Bénard et al., 2020). En considérant une potentielle interaction entre le paraquat et le DCV, nous nous attendions à une réduction des effets protecteurs de *Wolbachia* du fait qu'ils dépendent de la densité symbiotique (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2014). Nous avons pu confirmer ce résultat en observant une nette diminution de la survie au stade adulte des drosophiles colonisées par *wMelPop* exposées au paraquat et au DCV de façon combinée comparés à celles seulement exposés au DCV. Étonnamment, la charge virale des individus adultes colonisés ou non par *wMelPop* exposés aux deux agents stressants ne différait pas de celle des individus colonisés par *wMelPop* exposés seulement au DCV. Ce résultat est d'autant plus surprenant que la charge virale dans les conditions

de combinaison était plutôt faible, cependant très variable entre les individus. Dans nos expérimentations, l'âge de la mesure de la charge virale étant précoce (3 jours après émergence), il ne nous a pas permis d'identifier la dynamique de l'infection virale au cours de la vie des drosophiles. Il est alors possible que la variabilité observée dans le blocage de la réplication virale en présence de l'agent pro-oxydant ne soit pas maintenue après 3 jours. Cette variabilité dans le blocage de la réplication virale ne s'explique pas par un impact variable du paraquat sur la population symbiotique, car la densité globale des insectes a été réduite de manière similaire entre chaque individu, sans conséquence sur le nombre moyen de copies d'Octomom par bactérie par mouche. La variabilité dans le blocage de la réplication du DCV, mesurée à 3 jours chez des individus adultes colonisés par wMelPop ayant subi une surcharge oxydative, peut aussi être un reliquat de la protection antivirale induite par la surcharge oxydative au stade larvaire. Bien que nous n'ayons pas quantifié la charge virale à ce stade de développement, nous avons montré que l'exposition au paraquat (que les larves soient colonisées ou non par wMelPop) augmente la survie larvaire après infection virale. La faible densité bactérienne à ce stade de développement (Duarte et al., 2021) pourrait expliquer en partie pourquoi nous n'avons pas observé d'effet antiviral médié par wMelPop chez les larves (voir chapitre 2) et pourquoi nous n'avons pas observé de différence dans les effets antiviraux induit par une surcharge oxydative à ce stade de développement entre les individus colonisés ou non par wMelPop. En revanche, cet effet protecteur du paraquat au stade larvaire reste surprenant et pourrait s'expliquer par un effet antagoniste des agents stressants, soit par une action directe des agents pro-oxydants sur les particules virales, soit par une action indirecte *via* des dommages sur les cellules qui sont la cible du virus, empêchant ainsi sa réplication.

Chez les drosophiles, la pression de sélection exercée par une exposition chronique à des virus peut aussi mener à la sélection de caractères favorisant leur valeur sélective. Par exemple, certains allèles du gène *Pastrel* confèrent une résistance aux lignées exposées à DCV (Cogni et al., 2016; Magwire et al., 2012). Après neuf générations d'infection systémique chronique par le DCV au stade adulte, la fréquence de ces allèles de résistance augmente jusqu'à la fixation chez les lignées de drosophiles sélectionnées dans ces conditions (Martinez et al., 2016; Martins et al., 2014). Bien que nous ayons discriminé au préalable les lignées d'hôtes afin d'exclure l'allèle majeur de résistance à l'infection virale du gène *Pastrel*, afin de ne pas répliquer l'étude de Martinez et al. (2016), nous nous attendions à ce que cette pression de sélection induite par le DCV puisse révéler d'autres mécanismes de résistance après plusieurs générations d'exposition, qu'ils soient directement induits chez les hôtes ou bien indirectement par la sélection de variants bactériens plus protecteurs pour les drosophiles (avec un plus grand nombre moyen de copies d'*Octomom*). Bien qu'initialement nous ayons généré une certaine diversité génétique au sein des lignées d'hôte (par le mélange de 6 populations d'origines géographiques différentes), aucun autre caractère de résistance n'a vraisemblablement été sélectionné chez les hôtes aposymbiotiques après 12 générations d'évolution d'infection virale.

Il existe une différence notable avec les autres expérimentations qui ont pu montrer la sélection de caractères résistants : la méthode d'inoculation du virus. En effet, la fixation des gènes de résistance dans ces études a été observée dans un contexte d'inoculation artificielle du virus (par piqûre à l'âge adulte). Comparativement à une ingestion « naturelle » du DCV qui provoque une infection locale du tube digestif, l'inoculation artificielle du virus qui conduit à une infection systémique des drosophiles sollicite des voies immunitaires différentes et induit une mortalité plus forte et plus

rapide (Ferreira et al., 2014a), ce qui modifie la pression de sélection du DCV pour des gènes de résistance hôte ou bactérien. De façon surprenante, nous avons aussi observé lors de nos expérimentations une plus grande variabilité de survie chez les lignées de drosophiles non colonisées par *Wolbachia* ayant été exposées chroniquement à la combinaison paraquat-DCV, ce qui suggère une évolution des drosophiles vers la tolérance du DCV après évolution dans les différents régimes de sélection. Un plus grand nombre de générations d'exposition aurait peut-être pu mener à la sélection de mécanismes de résistance ou de tolérance, ayant un effet phénotypique probablement plus faible que *Pastrel*.

Lorsque la densité en *wMelPop* est importante chez les drosophiles la protection semble plus efficace que ces allèles de résistance, la pression de sélection qui conduit à la fixation des allèles du gène *Pastrel* est largement diminuée en présence de *Wolbachia* (Martinez et al., 2016). Cependant, l'élimination de *Wolbachia* chez ces lignées de drosophiles sélectionnées dans un contexte viral conduit de nouveau à une augmentation de la pression de sélection ciblant ces allèles de résistance et donc à leur fixation (Faria et al., 2018). L'exposition chronique au DCV dans une population où *Wolbachia* est fixée pourrait exercer une pression de sélection sur des caractères liés à la protection antivirale propres aux *Wolbachia* (comme elle peut le faire sur des caractères de résistance chez les hôtes), si ces mécanismes augmentent davantage la protection en condition d'infection virale. La corrélation entre le nombre de répétitions de la région génomique Octomom avec la densité en *wMelPop* (par conséquent avec les effets antiviraux associés) et l'héritabilité d'Octomom (Chrostek and Teixeira, 2018; Chrostek et al., 2013) nous ont conduit à considérer que le nombre de répétitions pourrait évoluer rapidement au cours des générations, de la même manière que les gènes de résistance des hôtes. Cependant,

nous n'avons pas non plus observé d'évolution de la population symbiotique chez les hôtes colonisés par *wMelPop* vers une augmentation du nombre de copies d'*Octomom* ou une amélioration de la valeur sélective de ces hôtes colonisés après une exposition chronique au DCV. Etant donné que l'infection virale est locale, il est possible que le nombre de copies d'*Octomom* moyen des bactéries soit supérieur dans les tissus spécifiquement ciblés par le virus tandis que les bactéries présentes dans la lignée germinale ne soient pas impactées par la présence du virus. La diversité (nombre de copies d'*Octomom*) déjà présente dans la lignée peut potentiellement être suffisante pour que les effets antiviraux médiés par *wMelPop* soient toujours efficaces à la génération suivante via une augmentation potentielle du nombre de copies moyen d'*Octomom* dans les tissus ciblés par le virus, cependant, il faudrait comparer le nombre de copies moyen entre les différents tissus lors d'une infection virale pour le confirmer. Dans le cas d'une exposition chronique à la combinaison des agents stressants, nous nous attendions aussi à la sélection de variants prolifératifs ayant un grand nombre de copies d'*Octomom*, du fait de la relâche de la sélection intra-hôte par le paraquat et de l'avantage sélectif de ces variants prolifératifs dans le cadre de protection anti-virale. De manière similaire, nous n'avons pas observé de modification de la diversité génétique de *wMelPop*, ni d'augmentation de la densité après 12 générations d'exposition chronique au paraquat combiné au DCV. La pression de sélection qu'exerce une surcharge oxydative en combinaison ou non avec l'infection virale ne semble donc pas suffisante pour conduire ni à une augmentation du nombre de copies d'*Octomom* chez *wMelPop*, ni à la sélection d'autres caractères permettant aux bactéries d'atteindre de plus fortes densités en présence d'un agent pro-oxydant.

L'influence d'une surcharge oxydative sur la densité en *wMelPop* étant forte et ne ciblant pas préférentiellement certains variant de *wMelPop*, elle diminue

l'expression des effets protecteurs de *wMelPop*. En revanche, l'effet sur la densité d'une exposition prolongée au paraquat est réversible, car en arrêtant l'exposition au paraquat, nous avons observé un retour aux niveaux de densité initiaux et l'expression de la protection conférée par *wMelPop*, sans qu'il n'y ait de changement dans l'intensité du blocage viral ou de la protection antivirale lors d'une infection virale ponctuelle. L'absence de réponse à la sélection de la part de l'association dans un contexte d'exposition chronique à la combinaison des agents stressants semble en décalage avec les la pression sélection attendue lors d'une exposition à ces différents agents stressants. En effet, l'influence d'une surcharge oxydative sur la densité, puisqu'elle n'impacte pas la composition génétique de la population de *wMelPop*, reflète une faible réponse à la sélection au niveau du nombre de copies d'*Octomom* chez les symbiotes dans un contexte d'infection virale. Il reste aussi à comprendre pourquoi la pression de sélection intra-hôte n'a pas eu d'influence forte sur la composition de la population bactérienne, dans un contexte où la pression de sélection inter-hôte est limitée par une diminution de la densité. Une autre piste qui pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'influence des pressions de sélection intra et inter-hôte sur le nombre de copies d'*Octomom* dans les lignées exposées chroniquement au paraquat seul ou en combinaison avec le DCV serait que des forces évolutives (autres que la sélection) limitent la fixation de certains caractères bactériens au cours des générations. Comme nous avons pu le montrer dans le premier chapitre, la dérive agit sur la variabilité du nombre de copies d'*Octomom* au sein des différentes lignées de drosophiles. Ainsi, dans notre expérience, la dérive a aussi pu constituer un frein à une sélection ciblant le nombre de copies d'*Octomom* lors d'une transmission aléatoire des différents variants bactériens (Mathé-Hubert et al., 2019).

Pour conclure, nos résultats ont révélé dans un premier temps que les agents stressants peuvent entrer en interaction et avoir soit des effets antagonistes au stade larvaire, soit des effets synergiques au stade adulte chez les drosophiles colonisées par *wMelpop* en réduisant la densité symbiotique. Ces expérimentations ont aussi pu démontrer une absence surprenante de réponse à la sélection de la part de l'association symbiotique, malgré nos attendus cohérents avec la littérature. Dans un contexte plus large, l'interaction potentielle des agents stressants peut donc avoir des effets inattendus sur l'adaptabilité des organismes aux environnements changeants. La réponse de cette association symbiotique en situation de perturbation environnementale démontre à quel point l'effort de prise en compte des potentiels effets synergiques ou antagonistes des agents stressants est nécessaire pour caractériser et prédire les effets des changements environnementaux sur la biosphère.

IV. Discussion générale

Ce travail de thèse a permis de mieux cerner la part relative des symbiotes et de l'environnement dans l'établissement du phénotype étendu des organismes mais aussi de mettre en évidence les forces évolutives qui influencent le phénotype. Nous avons d'abord identifié que la population symbiotique de *D. melanogaster* est susceptible de varier rapidement. La fluctuation au cours des générations du nombre de copies d'Octomom moyen de wMelPop dans les différents fonds génétiques d'hôtes en absence de perturbation environnementale suggère une influence forte de la dérive sur la transmission des symbiotes. Cependant, les différentes pressions de sélection induites par des agents stressants environnementaux n'ont pas modifié ni les densités, ni le nombres moyens de copies d'Octomom des wMelPop au cours des générations, et n'ont pas sélectionné des allèles de résistance dans les populations d'hôtes naturelles. Ces résultats démontrent donc une possibilité d'évolution rapide de la population symbiotique qui n'est pas nécessairement adaptative. Bien que nous ayons confirmé que wMelPop protège efficacement ses hôtes lorsque ces derniers sont exposés ponctuellement au DCV, nous n'avons pas observé de corrélation positive entre la densité symbiotique et l'efficacité de la protection antivirale. En revanche, lors d'une diminution artificielle de la densité symbiotique (via le stress oxydatif), l'efficacité de la protection antivirale a été annulée. Ces résultats suggèrent dans un premier temps que pour être effective, la protection antivirale médiée par wMelPop dépend d'un seuil minimum de densité bactérienne et dans un second temps que le nombre de copie d'Octomom n'est probablement pas une cible de la sélection dans le cadre de nos expérimentations.

Densité symbiotique : effets phénotypiques, régulations et réponse à la sélection

La relation entre partenaires chez les symbioses héritables transmises verticalement est souvent décrite comme résultant d'un compromis adaptatif maximisant les intérêts des deux partenaires (O'Neill et al., 1997). Dans ce contexte, on s'attend à ce que la réponse à la sélection dans une condition stressante favorise un alignement des intérêts entre les partenaires. En effet, sous l'influence de la sélection inter-hôtes, les symbiotes les plus coûteux devraient être éliminés de la population d'hôtes, tandis que dans un contexte de perturbation environnementale où le symbiote est bénéfique, les symbiotes les plus bénéfiques devraient être favorisés et maintenus dans la population d'hôtes (Alizon et al., 2013). A l'inverse, la sélection intra-hôte, qui met en compétition les symbiotes au sein d'un même hôte, favoriserait les symbiotes les plus prolifératif et donc les symbiotes potentiellement les plus coûteux (Alizon et al., 2013). Théoriquement, la pression de sélection inter-hôtes limiterait l'influence de la pression de sélection intra-hôte, or une perturbation environnementale qui modifie l'intensité des pressions de sélection intra- et inter-hôtes via un déséquilibre de la balance coûts / bénéfiques peut limiter ou accentuer l'intensité de ces pressions de sélections et ainsi impacter l'évolution de la population symbiotique. La densité de symbiotes et sa régulation constituent des facteurs majeurs dans l'expression de ces compromis. Dans nos expériences, la protection antivirale induite par *Wolbachia* dépend des conditions environnementales : la protection antivirale est réduite en cas de stress oxydatif, et associée à une forte réduction de la densité.

Bien que *wMelPop* présente un caractère pathogène lorsque les conditions permettent l'expression des coûts associés à sa densité dans les tissus de l'hôte, elle

peut aussi s'avérer bénéfique dans un contexte d'infection virale. Dans nos expériences, même lorsque cette bactérie apporte un bénéfice, nous n'avons pas observé de réponse adaptative à la sélection inter-hôtes se traduisant par une augmentation des bénéfices liés à la densité et au nombre de copies d'Octomom de *wMelPop* après plusieurs générations. Par ailleurs, la perte de l'effet protecteur en condition de combinaison d'agents stressants n'a pas mené à une modification de la densité et du nombre de copies d'Octomom de *wMelPop*, tout comme nous ne l'avons pas observée lors d'une exposition chronique à une surcharge oxydative, pourtant sensée limiter les coûts d'une augmentation du nombre de copies. La réponse à la pression de sélection intra-hôte de la population bactérienne n'est donc pas celle que nous attendions avec une symbiose héritable, alors même que nous avons observé une fluctuation possible du nombre de copies d'Octomom en absence de stress. Chez cette association et dans nos conditions expérimentales, le nombre de copies d'Octomom ne semble donc pas être influencé par les différentes pressions de sélections intra- et inter-hôtes que nous avons appliquées sur l'association via une exposition chronique à différents agents stressants. Enfin, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la densité et les effets antiviraux, mais une surcharge oxydative diminuant drastiquement la densité réduit ces effets antiviraux. Nous soupçonnons donc un effet seuil de la densité sur l'efficacité du blocage de la réplication virale et de la protection antivirale. Cet effet seuil est une première explication de l'absence de réponse adaptative dans un contexte d'infection virale chronique, car si les effets antiviraux (blocage de la réplication et protection antivirale) prodigués par les bactéries sont suffisamment efficaces pour protéger les hôtes à des densités plutôt faibles, il est probable que la pression de sélection inter-hôtes ne favorise pas nécessairement des symbiotes plus prolifératifs. Nous avons par ailleurs

observé que les effets antiviraux n'étaient pas homogènes entre les hôtes : le blocage de la réplication virale et la protection antivirale contre le DCV varient entre drosophiles adultes, sans qu'il n'y ait de lien avec la densité symbiotique. L'effet seuil, la variabilité dans les effets antiviraux et le fait que certains hôtes puissent développer leurs propres mécanismes de défense contre les infections virales (Cogni et al., 2016; Magwire et al., 2012) sont des facteurs qui pourraient limiter le potentiel adaptatif de *wMelPop* sous la pression de sélection inter-hôtes.

Dans la nature, les fluctuations des expositions au virus et la charge virale peuvent varier, ce qui peut d'autant plus limiter la sélection et la fixation de variants symbiotiques bénéfiques dans un contexte viral. La présence de symbiotes peut également être coûteuse en l'absence d'agent stressant lorsque la réponse est médiée par une forte densité symbiotique qui impose des coûts métaboliques (Martinez et al., 2015 ; Hopkins et al., 2017). Dans le cas d'une perturbation environnementale transitoire qui tend à favoriser une augmentation de densité des symbiotes chez leurs hôtes, il se pose la question du maintien de ces niveaux de densité (voire du maintien de la relation symbiotique) en absence de stress environnemental, car les coûts associés à de fortes densités ne seront plus compensés par les bénéfices apportés par les symbiotes qui sont stress-dépendants. En effet, bien que les symbiotes comme *Wolbachia* ou *Spiroplasma* confèrent une protection contre les ennemis naturels de leurs hôtes qui favorisent leur succès au sein des populations d'hôtes, ces symbiotes peuvent diminuer en fréquence dans les populations qui ne sont plus exposées à ces ennemis naturels, en raison des coûts associés à leur forte densité et de l'absence d'effet bénéfique en absence de pathogène (Hoffmann et al., 1998; O'Neill et al., 1997; Oliver et al., 2008). Par extension, des variants génétiques hôtes ou symbiotiques

conduisant à des niveaux élevés de densité peuvent être contre-sélectionnés dans un environnement où l'agent pathogène est absent ou en faible fréquence.

Symbiose et potentiel adaptatif

Nous n'avons pas observé de variation de la densité et du nombre de copies d'Octomom dans nos expériences d'évolution expérimentale, en revanche, *wMelPop* présente chez ses hôtes une grande variabilité génétique en terme de copies d'Octomom dans des conditions où les coûts ne s'expriment pas (en laboratoire à température constante inférieure à 29°C), et qui de plus fluctue au cours des générations sous l'influence de la dérive génétique. Cette forte dérive, liée à la transmission aléatoire des différents variants symbiotiques à chaque génération, pourrait être un facteur majeur qui empêche la sélection des caractères maximisant les valeurs sélectives des partenaires (Mathé-Hubert et al., 2019; O'Fallon, 2008). Ceci expliquerait aussi en partie pourquoi nous n'avons pas observé de forte influence des pressions de sélection intra- et inter-hôtes sur la population bactérienne dans les conditions de stress que nous avons appliquées.

Nos expérimentations suggèrent que les populations de symbiotes à transmission verticale présentent un faible potentiel adaptatif. Ces résultats ne sont pas forcément contradictoires avec les nombreux cas où le caractère adaptatif de la symbiose est clairement établi, si l'on considère d'une part l'acquisition de nouveaux symbiotes et d'autre part l'évolution de symbioses déjà établies. La symbiose peut être considérée comme une source d'adaptation pour les hôtes à de nouveaux environnements, car l'acquisition de nouveaux symbiotes peut s'avérer être une réponse rapide à l'échelle de la population d'hôte (Hedges et al., 2008; Hoffmann et al., 1998; Sudakaran et al., 2017). Les symbiotes constituent un "pool de gènes"

potentiellement impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques déjà adaptées à ce nouvel environnement. Ces symbiotes peuvent donc faire partie d'une réponse adaptative aux changements environnementaux, et éventuellement arriver à la fixation si les contraintes biotiques et abiotiques sont stables tout en imposant une assez forte pression de sélection, et si les bénéfices apportés par les symbiotes sont supérieurs à leurs coûts. Ceci est notamment le cas des symbiotes à transmission verticale, qui seront durablement associés à leur hôte.

Cependant, une fois ces associations établies, elles pourraient présenter un faible potentiel adaptatif, du fait d'une diversité génétique réduite et de l'influence forte de la dérive génétique. La présence continue de symbiotes transmis verticalement peut même conduire à l'évolution de la dépendance au-delà de la contribution originale du symbiote. Chez les pucerons, l'élimination de *Buchnera* par un traitement antibiotique perturbe le développement (Koga et al., 2007). Les femelles de pucerons privées de *Buchnera*, à cause de la chaleur, des antibiotiques ou de la vieillesse, produisent peu ou pas de descendant alors même que leur alimentation est supplémentée en acides aminés essentiels qui les rendent dépendant à la complémentation alimentaire apportée par *Buchnera* (Wilkinson and Ishikawa, 2000). Cette dépendance à cette bactérie pour le développement reflète 150 millions d'années de fixation de mutations chez les pucerons qui sont bénéfiques ou neutres en présence de *Buchnera* mais potentiellement délétères en son absence. Ainsi, l'association avec des symbiotes nutritionnels est une porte d'entrée vers la dépendance, même lorsque ces nutriments ne sont pas directement impliqués dans l'évolution de cette dépendance développementale. Ces éléments montrent les 'limites évolutives' des symbioses à transmission verticale. Ces limites sont encore plus évidentes dans le cas d'environnements changeants. Dans ces cas extrêmes,

l'établissement de symbioses avec des symbiotes transmis horizontalement pourrait être favorisé, car ils constituent un ensemble flexible de réponses disponible dans l'environnement (à condition qu'ils soient accessibles lors de la perturbation). Le potentiel adaptatif lié à la symbiose semble donc majoritairement dépendre de l'acquisition d'un pool de gènes 'prêt à l'emploi', plutôt que de la coévolution/coadaptation poussée entre partenaires établis.

Enfin, la présence de symbiotes peut indirectement impacter le potentiel adaptatif de l'hôte lorsque la sélection interfère avec la sélection des gènes de l'hôte qui limitent les impacts des agents stressants. En effet, la présence de symbiotes protecteurs peut diminuer la sélection pour les mécanismes immunitaires de l'hôte lorsque le coût de l'immunité de l'hôte est plus élevé que celle des symbiotes (Metcalf and Koskella, 2019). Après une évolution dans un contexte d'infection virale, la présence de *Wolbachia* chez les drosophiles empêche notamment la fixation des allèles du gène *pastrel* (Martinez et al., 2016), et ce phénomène est réversible dès lors que *Wolbachia* est éliminée des populations d'hôtes (Faria et al., 2018).

Lutte biologique

En plus de s'inscrire dans le cadre de la compréhension théorique de la dynamique évolutive des symbioses à transmission verticale, ce travail permet de mettre en perspective les programmes de lutte contre les insectes vecteurs de maladies virales qui emploient *Wolbachia* (Bull and Turelli, 2013; Ford et al., 2020; Zélé et al., 2018). Les stratégies de lutte antivectorielles utilisent *Wolbachia* comme un agent de lutte biologique en élevant et en relâchant des moustiques colonisés par différentes souches de *Wolbachia* dans le but que la bactérie limite la charge virale au sein des populations naturelles. En effet, l'introduction de *Wolbachia* dans des

populations de moustiques qui ne l'hébergent pas naturellement -via des transinfections- ont eu pour conséquence de réduire considérablement la charge virale dans les glandes salivaires des moustiques, ainsi que le taux de transmission de virus comme la dengue, le chikungunya ou encore le virus du Nil occidental (Bian et al., 2010; Blagrove et al., 2012; Frentiu et al., 2010; Moreira et al., 2009; Mousson et al., 2010; Walker et al., 2011). Ces études sur les associations *Wolbachia*-moustique nous apprennent que cette bactérie peut agir comme inhibiteur de la réplication, de la dissémination et de la transmission de virus d'intérêt médical et confirment que les stratégies de lutte anti-vectorielle employant *Wolbachia* sont pertinentes et prometteuses. Cependant, les associations naturelles *Wolbachia*-moustiques ne présentent pas d'effet inhibiteur sur la réplication virale aussi fort que celui des associations artificielles. Par exemple, la souche *wAlbB* indigène d'*Aedes albopictus* présente un effet inhibiteur faible ou nul sur la réplication du virus de la dengue chez son espèce native (Glaser and Meola, 2010; Mousson et al., 2010, 2012), bien qu'elle présente un fort effet antiviral contre le virus de la dengue lorsqu'elle est transinfectée chez *Ae. aegypti*, (Bian et al., 2013; Xi et al., 2005). Ces observations soulèvent la question de l'influence de la coévolution moustique-*Wolbachia* sur l'évolution de l'intensité de blocage des virus, et de la pérennité de l'efficacité des méthodes de lutte.

Étant donné que les effets anti-pathogènes médiés par *Wolbachia* sembleraient être liés à la densité dans les tissus de l'insecte (Martinez et al., 2014), la souche très proliférative *wMelPop* a été logiquement étudiée pour déterminer si elle serait un bon candidat pour la lutte anti-vectorielle chez les moustiques. Cette souche a donc été transmise artificiellement de *D. melanogaster* à *Ae. aegypti* par injection intra-thoracique. Elle a ainsi présenté de très fort niveau de blocage de la réplication virale (Moreira et al., 2009) comparativement à d'autres souches issues de *D.*

melanogaster (Hoffmann et al., 2014; Walker et al., 2011). Cependant, l'infection par *wMelPop* entraîne également des coûts substantiels, non seulement pour la longévité des moustiques mais aussi pour la viabilité de leurs œufs et leurs larves (McMeniman and O'Neill, 2010; Ross et al., 2014; Yeap et al., 2011). L'impact sur la longévité des adultes réduit de fait la propension des moustiques à transmettre les maladies qu'ils vectorisent, mais limite aussi la capacité de cette souche à se fixer dans les populations d'hôtes. De plus, les virus étudiés dans le cadre de la lutte anti-vectorielle qui infectent les moustiques ne sont pas délétères pour leur hôte, contrairement aux virus qui infectent les drosophiles (comme le DCV). Ainsi, les coûts associés à la présence de *wMelPop* chez les moustiques ne sont pas compensés par les bénéfices liés à la protection antivirale que nous avons observé chez *D. melanogaster*. Cette absence d'effet protecteur chez les moustiques à des conséquences différentes sur l'équilibre des sélections intra- et inter-hôtes que chez les drosophiles. En absence d'effet protecteur la sélection inter-hôte tendrait à limiter les variants de *wMelPop* très prolifératif et coûteux pour les moustiques.

Les études sur la lutte anti-vectorielle médiée par *Wolbachia* chez les moustiques montrent aussi que la conjugaison de facteurs génétiques hôtes et symbiotiques peut largement influencer le caractère protecteur/inhibiteur de telles associations. Ainsi, la coadaptation entre hôtes et symbiotes peut influencer l'établissement de mécanismes de protection antivirale. Il semblerait que l'effet inhibiteur médié par *Wolbachia* chez les moustiques soit en partie attribuable au phénomène de *priming* immunitaire (l'exposition à un premier agent pathogène qui n'entraîne pas d'infection systémique chez l'hôte peut " amorcer " la réponse immunitaire et accroître la protection contre une nouvelle exposition), qui est plus souvent observé dans les associations nouvellement créées (Bian et al., 2010;

Kambris et al., 2009; Moreira et al., 2009) comparés aux associations co-évoluées (Bourtzis et al., 2000; Wong et al., 2011). Si le coût de cette réaction immunitaire à *Wolbachia* est plus important que les bénéfices perçus par l'hôte (ce qui est le cas chez les moustiques car les virus ne sont pas pathogènes), on peut s'attendre à ce que l'hôte développe une tolérance à l'infection par *Wolbachia*, qui peut s'accompagner par une réduction de l'effet inhibiteur contre les virus (Vavre and Charlat, 2012).

Il est donc difficile de prévoir l'issue évolutive d'associations artificielles comme chez le moustique, tout comme il est difficile d'extrapoler ces études chez les moustiques à des systèmes où les virus sont pathogènes pour leurs hôtes. En effet, bien que sur le court terme évolutif, nous observons des bénéfices directs pour l'Homme à l'introduction de *Wolbachia* dans les populations d'insectes vecteurs, à plus long terme évolutif, les conflits entre parasites transmis verticalement et horizontalement peuvent mener à une virulence accrue des parasites transmis horizontalement (Jones et al., 2010). La stabilité des associations impliquant *Wolbachia* et l'évolution de la relation entre cette bactérie et ses hôtes dépend aussi de l'écologie de la population hôte. Par exemple, si *wMelPop* est introduite dans une population hôte de moustiques où les sites de reproduction conduisent de faibles densités bactériennes (températures inférieures à 25°C), cette souche a plus de chances d'envahir et de la coloniser durablement. En revanche, de plus fortes températures qui conduisent à de plus fortes densités bactériennes dans les tissus des insectes augmentera les coûts associés à la présence de la bactérie, diminuant de fait la fréquence seuil de *Wolbachia* requise pour une invasion efficace de *wMelPop* dans les populations d'hôtes moustiques (Hancock et al., 2011; Ross et al., 2014). En plus des conditions climatiques, d'autres influences environnementales comme la pollution

peuvent modifier les niveaux de densité bactérienne chez les insectes. C'est le cas par exemple du paraquat, qui tend à réduire la densité bactérienne et par conséquent les coûts potentiels associés à la présence de *Wolbachia*. Ainsi, l'évolution des systèmes symbiotiques artificiels des moustiques dépendent de nombreux facteurs qui sont à la fois des déterminants génétiques hôtes et bactériens et les conditions environnementales dans lesquelles évoluent ces associations artificielles.

Les modifications climatiques affectent la dynamique de transmission, la propagation géographique des maladies à transmission vectorielle ainsi que l'efficacité des stratégies de lutte biologique (Rocklöv and Dubrow, 2020). La stabilité de l'association dans les populations de moustiques et l'efficacité du blocage de la réplication virale peuvent alors être altérés par les changements globaux en cours (ex : exposition à des agents pro-oxydants). Il est donc nécessaire de pouvoir prédire l'efficacité des effets antiviraux médiés par *Wolbachia* dans différents contextes environnementaux et d'identifier les souches de *Wolbachia* les plus efficaces dans le blocage de la réplication des virus, tout en étant optimales dans un contexte stressant (e.g., une surcharge oxydative). Ceci permettrait d'affiner nos moyens de lutte et de mieux appréhender l'évolution des partenaires dans un contexte naturel, soumis à des agents stressants d'origine anthropique notamment. Cet effort de recherche sur les associations symbiotiques impliquant *Wolbachia* dans des environnements changeants est nécessaire pour affiner nos stratégies de lutte. Au cours de cette thèse, nous avons pu identifier que l'association présentait un faible potentiel adaptatif, alors même que *Wolbachia* apportait un bénéfice direct sur la valeur sélective des hôtes dans un contexte d'infection virale. La faible réponse à la sélection que nous avons observé démontre aussi une certaine inefficacité de la réponse adaptative de l'association symbiotique dans un contexte où la protection conférée par *Wolbachia*

est limitée (stress oxydatif) ou bien si le virus développe des mécanismes aboutissant au contournement de l'effet inhibiteur de *Wolbachia* (Bull and Turelli, 2013). Ainsi l'impact des virus sur la valeur sélective des hôtes et le potentiel adaptatif des virus qui sont la cible de cette lutte biologique sont donc aussi déterminants dans l'issue évolutive de ces associations symbiotiques, s'ils présentent des coûts pour leurs hôtes ou non et s'ils développent des stratégies d'évitement de l'action inhibitrice de *Wolbachia* par exemple. Les génomes de *Wolbachia* et/ou des hôtes pourraient également évoluer en réponse à des changements dans le virus, en particulier si ces changements affectent la valeur sélective de l'hôte (Hoffmann et al., 2015), cependant ces changements si ils ont lieu, ne s'opèreraient pas rapidement, étant donné le faible potentiel évolutif que nous avons observé au cours notre expérience d'évolution sur 12 générations.

Conclusion et perspectives

L'approche d'évolution expérimentale qui a été employée lors de ce travail a l'avantage de pouvoir tester les influences chroniques des perturbations environnementales sur chacun des partenaires symbiotiques et sur leur relation. Cette approche permet une caractérisation des réponses phénotypiques des organismes, mais aussi une identification des mécanismes moléculaires mis en place dans la réponse de ces derniers face aux contraintes environnementales. Nous avons ainsi montré que les agents stressants peuvent interagir entre eux et qu'ils peuvent entraîner des conséquences significativement différentes sur la valeur sélective de l'association symbiotique. Une partie du projet de thèse visait à caractériser les réponses mécanistiques respectives de chacun des partenaires symbiotiques dans les différentes conditions stressantes, au cours d'une réponse immédiate ou après évolution expérimentale. Par une approche de transcriptomique comparative réalisée par Dual RNA-sequencing, permettant de quantifier les niveaux d'expression des gènes de chacun des partenaires au sein d'un même individu hôte (Westermann et al., 2017), nous avons cherché à identifier les réponses moléculaires de l'association aux différentes contraintes environnementales imposées de façon ponctuelle ou chronique tout au long de l'expérience d'évolution expérimentale. Cette analyse n'est pas finalisée, mais elle pourrait révéler des mécanismes impliqués dans la réponse immédiate aux agents stressants. Par ailleurs, ces analyses pourront mettre en évidence les gènes potentiellement sous sélection au cours de l'expérience d'évolution expérimentale, et qui reflèteraient les mécanismes clés dans la réponse aux agents stressants ou dans la régulation de la densité bactérienne. Bien que nous n'ayons pas observé de fortes modifications phénotypiques après une exposition chronique aux

agents stressants sur 12 générations, il est possible que des mécanismes de compensation aient pu être sélectionnés au cours de cette expérience d'évolution (Grether, 2005).

Nos résultats démontrent également certaines limites au potentiel adaptatif de l'association *wMelPop-D. melanogaster*. En effet, la dérive constitue une des forces évolutives qui semble des plus influentes sur ce système symbiotique dans nos conditions expérimentales. Associée à la faible diversité génétique initiale, ces phénomènes pourraient être en partie responsables d'une absence de réponse efficace à la sélection imposée par les contraintes environnementales. L'adaptation par la symbiose serait-elle nécessairement associée à l'acquisition de nouveaux partenaires déjà adaptés aux nouvelles conditions rencontrées ? L'étude d'autres types de symbiose aux modes de transmission variés permettrait d'évaluer les modalités selon lesquelles les associations symbiotiques constituent une réponse efficace à l'adaptation à de nouveaux environnements, potentiellement changeants. Ceci paraît d'autant plus important dans la situation actuelle de changements globaux et de prise de conscience de la part de la communauté scientifique de l'importance de la symbiose dans le règne du vivant. Cependant, il est nécessaire que les recherches autour de ces thématiques s'appuient sur des approches multiples permettant une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires, mais aussi évolutifs en jeu dans les relations symbiotiques.

V. Références bibliographiques

- Ahmad, M., Chaudhary, S.U., Afzal, A.J., and Tariq, M. (2015). Starvation-Induced Dietary Behaviour in *Drosophila melanogaster* Larvae and Adults. *Sci. Rep.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep14285>.
- Akman Gündüz, E., and Douglas, A.E. (2012). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 987–991. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1476>.
- Aksoy, S. (2000). Tsetse - A haven for microorganisms. *Parasitol. Today* 16, 114–118. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01606-3](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01606-3).
- Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., and Van Baalen, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: History, current state of affairs and the future. *J. Evol. Biol.* 22, 245–259. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x>.
- Alizon, S., de Roode, J.C., and Michalakis, Y. (2013). Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecol. Lett.* 16, 556–567. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>.
- Almand, E.A., Moore, M.D., and Jaykus, L.A. (2017). Virus-bacteria interactions: An emerging topic in human infection. *Viruses* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3390/v9030058>.
- Anderson, R.M., and May, R.M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 85, 411–426. <https://doi.org/10.1017/S0031182000055360>.
- Andrews, E.S., Crain, P.R., Fu, Y., Howe, D.K., and Dobson, S.L. (2012). Reactive Oxygen Species Production and *Brugia pahangi* Survivorship in *Aedes polynesiensis* with Artificial *Wolbachia* Infection Types. *PLoS Pathog.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003075>.
- Bailly-Bechet, M., Martins-Simões, P., Szöllősi, G.J., Mialdea, G., Sagot, M.-F., and Charlat, S. (2017). How long does *Wolbachia* remain on board? *Mol. Biol. Evol.* 34, 1183–1193. .
- Baker, D.M., Freeman, C.J., Wong, J.C.Y., Fogel, M.L., and Knowlton, N. (2018). Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. *ISME J.* 12, 921–930. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0046-8>.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495. .
- Barton, E.S., White, D.W., Cathelyn, J.S., Brett-McClellan, K.A., Engle, M., Diamond, M.S., Miller, V.L., and Virgin, H.W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 447, 326–329. .
- De Bary, A. (1879). Die erscheinung der symbiose. Vortrag auf der Versammlung der Naturforschung und Ärzte zu Cassel. 121, 1–30. .
- Bashey, F. (2015). Within-host competitive interactions as a mechanism for the maintenance of parasite diversity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20140301. .
- Bénard, A., Vavre, F., and Kremer, N. (2020). Stress & Symbiosis: Heads or Tails? *Front. Ecol. Evol.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00167>.
- Bénard, A., Henri, H., Noûs, C., Vavre, F., and Kremer, N. (2021). *Wolbachia* load variation in *Drosophila* is more likely caused by drift than by host genetic factors. *PLoS Evol Biol* <https://doi.org/10.1101/2020.11.29.402545>. .
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., and Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>.
- Bian, G., Zhou, G., Lu, P., and Xi, Z. (2013). Replacing a Native *Wolbachia* with a Novel Strain

Results in an Increase in Endosymbiont Load and Resistance to Dengue Virus in a Mosquito Vector. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002250>.

Biron, D.G., Marché, L., Ponton, F., Loxdale, H.D., Galéotti, N., Renault, L., Joly, C., and Thomas, F. (2005). Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: A proteomics approach. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 272, 2117–2126. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3213>.

Blagrove, M.S.C., Arias-Goeta, C., Failloux, A.B., and Sinkins, S.P. (2012). *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 255–260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112021108>.

Blagrove, M.S.C., Arias-Goeta, C., Di Genua, C., Failloux, A.B., and Sinkins, S.P. (2013). A *Wolbachia* wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002152>.

Blair, C.D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 6, 265–277. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.11>.

Bonilla, E., Medina-Leendertz, S., Villalobos, V., Molero, L., and Bohórquez, A. (2006). Paraquat-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: effects of melatonin, glutathione, serotonin, minocycline, lipoic acid and ascorbic acid. *Neurochem. Res.* 31, 1425–1432. .

Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Markakis, G., and Savakis, C. (1996). *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144, 1063–1073. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.3.1063>.

Bourtzis, K., Pettigrew, M.M., and O'Neill, S.L. (2000). *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Mol. Biol.* 9, 635–639. .

Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., et al. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 24–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000856>.

Brennan, L.J., Keddie, B.A., Braig, H.R., and Harris, H.L. (2008). The endosymbiont *Wolbachia pipientis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line. *PLoS One* 3, e2083. .

Brennan, L.J., Haukedal, J.A., Earle, J.C., Keddie, B., and Harris, H.L. (2012). Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Insect Mol. Biol.* 21, 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x>.

Bronstein, J.L. (1994). Our current understanding of mutualism. *Q. Rev. Biol.* 69, 31–51. .

Brownlie, J.C., and Johnson, K.N. (2009). Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* 17, 348–354. .

Brownstein, J.S., Hett, E., and O'Neill, S.L. (2003). The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J. Invertebr. Pathol.* 84, 24–29. .

Brun, G., Plus, N., Ashburner, M., and Wright, T.R.F. (1980). The genetics and biology of *Drosophila*.

Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms.

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. .

Bull, J.J., and Turelli, M. (2013). *Wolbachia* versus dengue: evolutionary forecasts. *Evol. Med. Public Heal.* 2013, 197–207. .

Cao, C., Cogni, R., Barbier, V., and Jiggins, F.M. (2017). Complex coding and regulatory polymorphisms in a restriction factor determine the susceptibility of *Drosophila* to viral infection. *Genetics* 206, 2159–2173. <https://doi.org/10.1101/117846>.

Caragata, E.P., Rancès, E., Hedges, L.M., Gofton, A.W., Johnson, K.N., O'Neill, S.L., and McGraw, E.A. (2013). Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. *PLoS Pathog.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459>.

Caragata, E.P., Dutra, H.L.C., Sucupira, P.H.F., Ferreira, A.G.A., and Moreira, L.A. (2021). *Wolbachia* as translational science: controlling mosquito-borne pathogens. *Trends Parasitol.* 37, 1050–1067. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.06.007>.

Casiraghi, M., Bordenstein, S.R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., and Bandi, C. (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: Clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology* 151, 4015–4022. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28313-0>.

Chen, C.-Y., Lai, C.-Y., and Kuo, M.-H. (2009). Temperature effect on the growth of *Buchnera* endosymbiont in *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae). *Symbiosis* 49, 53–59. .

Cheng, Q., and Aksoy, S. (1999). Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes in vivo in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Mol. Biol.* 8, 125–132. .

Cheng, Q., Ruel, T.D., Zhou, W., Mooloo, S.K., Majiwa, P., O'Neill, S.L., and Aksoy, S. (2000). Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Med. Vet. Entomol.* 14, 44–50. .

Cherry, S., and Perrimon, N. (2004). Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. *Nat Immunol.* 5, 81–87. <https://doi.org/10.1038/ni1019>.

Cherry, S., Doukas, T., Armknecht, S., Whelan, S., Wang, H., Sarnow, P., and Perrimon, N. (2005). Genome-wide RNAi screen reveals a specific sensitivity of IRES-containing RNA viruses to host translation inhibition. *Genes Dev.* 19, 445–452. <https://doi.org/10.1101/gad.1267905>.

Cherry, S., Kunte, A., Wang, H., Coyne, C., Rawson, R.B., and Perrimon, N. (2006). COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathog.* 2, 0900–0912. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020102>.

Cho, K.O., Kim, G.W., and Lee, O.K. (2011). *Wolbachia* bacteria reside in host Golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022703>.

Christian, P.D., and Scotti, P.D. (1998). Picornalike Viruses of Insects. *The Insect Viruses* 301–336. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5341-0_10.

Chrostek, E., and Teixeira, L. (2015). Mutualism Breakdown by Amplification of *Wolbachia* Genes. *PLoS Biol.* 13, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002065>.

Chrostek, E., and Teixeira, L. (2018). Within host selection for faster replicating bacterial symbionts. *PLoS One* 13, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191530>.

- Chrostek, E., Marialva, M.S.P., Esteves, S.S., Weinert, L.A., Martinez, J., Jiggins, F.M., and Teixeira, L. (2013). *Wolbachia* Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLoS Genet.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003896>.
- Chrostek, E., Marialva, M.S.P., Yamada, R., O'Neill, S.L., and Teixeira, L. (2014). High antiviral protection without immune upregulation after interspecies *Wolbachia* transfer. *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099025>.
- Chtarbanova, S., Lamiable, O., Lee, K.-Z., Galiana, D., Troxler, L., Meignin, C., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Daeffler, L., and Imler, J.-L. (2014). *Drosophila* C Virus Systemic Infection Leads to Intestinal Obstruction. *J. Virol.* 88, 14057–14069. <https://doi.org/10.1128/jvi.02320-14>.
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* (80-.). 292, 104–106. .
- Clay, K. (2014). Defensive symbiosis: A microbial perspective. *Funct. Ecol.* 28, 293–298. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258>.
- Cogni, R., Cao, C., Day, J.P., Bridson, C., and Jiggins, F.M. (2016). The genetic architecture of resistance to virus infection in *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 25, 5228–5241. <https://doi.org/10.1111/mec.13769>.
- Cogni, R., Ding, S.D., Pimentel, A.C., Day, J.P., and Jiggins, F.M. (2021). *Wolbachia* reduces virus infection in a natural population of *Drosophila*. *Commun. Biol.* 4, 1–7. .
- Cook, P.E., McMeniman, C.J., and O'Neill, S.L. (2008). Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Transgenes. Manag. Vector-Borne Dis.* 126–140. .
- Corbin, C., Heyworth, E.R., Ferrari, J., and Hurst, G.D.D. (2017). Heritable symbionts in a world of varying temperature. *Heredity* (Edinb). 118, 10–20. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.71>.
- Cunning, R., and Baker, A.C. (2014). Not just who, but how many: the importance of partner abundance in reef coral symbioses. *Front. Microbiol.* 5, 400. .
- Dale, C., and Moran, N.A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 126, 453–465. .
- Dawkins, R. (1982). *The extended phenotype* (Oxford University Press Oxford).
- DeJong, R.J., Miller, L.M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S., and Barillas-Mury, C. (2007). Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2121–2126. .
- Delignette-Muller, M.L., and Dutang, C. (2015). {fitdistrplus}: An {R} Package for Fitting Distributions. *J. Stat. Softw.* 64, 1–34. .
- Detournay, O., and Weis, V.M. (2011). Role of the sphingosine rheostat in the regulation of cnidarian-dinoflagellate symbioses. *Biol. Bull.* 221, 261–269. .
- Ding, S.W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* 130, 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039>.
- Dobson, S.L., Bourtzis, K., Braig, H.R., Jones, B.F., Zhou, W., Rousset, F., and O'Neill, S.L. (1999). *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00119-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00119-2).

- Doran, M.L., Knee, J.M., Wang, N., Rzezniczak, T.Z., Parkes, T.L., Li, L., and Merritt, T.J.S. (2017). Metabolomic analysis of oxidative stress: superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.* *113*, 323–334. .
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.* *6*, 946–953. <https://doi.org/10.1038/ni1237>.
- Douglas, A.E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.* *23*, 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>.
- Douglas, A.E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* *60*, 17. .
- Douglas, A.E., and Werren, J.H. (2016). Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio* *7*, e02099-15. .
- Douglas, A.E., Bouvaine, S., and Russell, R.R. (2011). How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *278*, 333–338. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1563>.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*
- Duarte, E.H., Carvalho, A., López-Madrugal, S., Costa, J., and Teixeira, L. (2021). Forward genetics in *Wolbachia*: Regulation of *Wolbachia* proliferation by the amplification and deletion of an addictive genomic island. *PLoS Genet.* *17*, e1009612. .
- Duneau, D., Ferdy, J.B., Revah, J., Kondolf, H., Ortiz, G.A., Lazzaro, B.P., and Buchon, N. (2017). Stochastic variation in the initial phase of bacterial infection predicts the probability of survival in *D. melanogaster*. *Elife* *6*, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.28298>.
- Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., Loire, E., Ménard, C., Bouchez, O., Vavre, F., et al. (2018). Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. *Curr. Biol.* *28*, 1896-1902.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038>.
- Dutton, T.J., and Sinkins, S.P. (2004). Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Mol. Biol.* *13*, 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00490.x>.
- Enders, L.S., and Miller, N.J. (2016). Stress-induced changes in abundance differ among obligate and facultative endosymbionts of the soybean aphid. *Ecol. Evol.* *6*, 818–829. <https://doi.org/10.1002/ece3.1908>.
- Engelstädter, J., and Hurst, G.D.D. (2009). The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *40*, 127–149. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120206>.
- Ewald, P.W. (1983). Host-Parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *14*, 465–485. .
- Ewald, P.W. (1987). Transmission Modes and Evolution of the Parasitism-Mutualism Continuum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *503*, 295–306. .
- Fallon, A.M., Kurtz, C.M., and Carroll, E.M. (2013). The oxidizing agent, paraquat, is more toxic to *Wolbachia* than to mosquito host cells. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* *49*, 501–507. .
- Faria, V.G., Martins, N.E., Magalhães, S., Paulo, T.F., Nolte, V., Schlötterer, C., Sucena, É., and Teixeira, L. (2016). *Drosophila* Adaptation to Viral Infection through Defensive Symbiont Evolution. *PLoS Genet.* *12*, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006297>.

- Faria, V.G., Martins, N.E., Schlötterer, C., and Sucena, É. (2018). Readapting to DCV infection without *Wolbachia*: Frequency changes of *Drosophila* antiviral alleles can replace endosymbiont protection. *Genome Biol. Evol.* *10*, 1783–1791. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy137>.
- Fast, E.M., Toomey, M.E., Panaram, K., Desjardins, D., Kolaczyk, E.D., and Frydman, H.M. (2011). *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. *Science* (80-.). *334*, 990–992. .
- Ferens, W.A., and Hovde, C.J. (2000). Antiviral activity of Shiga toxin 1: Suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect. Immun.* *68*, 4462–4469. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4462-4469.2000>.
- Ferree, P.M., Frydman, H.M., Li, J.M., Cao, J., Wieschaus, E., and Sullivan, W. (2005). *Wolbachia* utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* Oocyte. *PLoS Pathog.* *1*, 0111–0124. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010014>.
- Ferreira, Á.G., Naylor, H., Esteves, S.S., Pais, I.S., Martins, N.E., and Teixeira, L. (2014a). The Toll-Dorsal Pathway Is Required for Resistance to Viral Oral Infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* *10*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004507>.
- Ferreira, Á.G., Naylor, H., Esteves, S.S., and Teixeira, L. (2014b). The Toll-Dorsal pathway is required for resistance to viral oral infection in *Drosophila*. *PloS Pathog.* *10*, e1004507. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004507>.
- Fine, P.E.M. (1975). Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *266*, 173–194. .
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* *194*, 7–15. .
- Flórez, L. V., Biedermann, P.H.W., Engl, T., and Kaltenpoth, M. (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* *32*, 904–936. <https://doi.org/10.1039/c5np00010f>.
- Ford, S.A., Albert, I., Allen, S.L., Chenoweth, S.F., Jones, M., Koh, C., Sebastian, A., Sigle, L.T., and McGraw, E.A. (2020). Artificial selection finds new hypotheses for the mechanism of *Wolbachia*-Mediated dengue blocking in mosquitoes. *Front. Microbiol.* *11*, 1456. .
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., et al. (2005). The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol.* *3*, 0599–0614. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030121>.
- Foster, K.R., Schluter, J., Coyte, K.Z., and Rakoff-Nahoum, S. (2017). The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* *548*, 43–51. .
- Frentiu, F.D. (2017). Lipids and Pathogen Blocking by *Wolbachia*. *Trends Parasitol.* *33*, 916–917. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.007>.
- Frentiu, F.D., Robinson, J., Young, P.R., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2010). *Wolbachia*-Mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. *PLoS One* *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013398>.
- Fry, A.J., and Rand, D.M. (2002). *Wolbachia* interactions that determine *Drosophila melanogaster* survival. *Evolution* (N. Y.). *56*, 1976–1981. .
- Fry, A.J., Palmer, M.R., and Rand, D.M. (2004). Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* (Edinb). *93*, 379–389. .
- Frydman, H.M., Li, J.M., Robson, D.N., and Wieschaus, E. (2006). Somatic stem cell niche

tropism in *Wolbachia*. *Nature* 441, 509–512. <https://doi.org/10.1038/nature04756>.

Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat. Immunol.* 7, 590–597. <https://doi.org/10.1038/ni1335>.

Geoghegan, V., Stainton, K., Rainey, S.M., Ant, T.H., Dowle, A.A., Larson, T., Hester, S., Charles, P.D., Thomas, B., and Sinkins, S.P. (2017). Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* cells. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00610-8>.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>.

Giorgini, M., Bernardo, U., Monti, M.M., Nappo, A.G., and Gebiola, M. (2010). Rickettsia symbionts cause parthenogenetic reproduction in the parasitoid wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2589–2599. .

Glaser, R.L., and Meola, M.A. (2010). The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to west nile virus infection. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>.

Gomariz-Zilber, E., Poras, M., and Thomas-Orillard, M. (1995). *Drosophila C* virus: Experimental study of infectious yields and underlying pathology in *Drosophila melanogaster* laboratory populations. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 243–247. <https://doi.org/10.1006/jjpa.1995.1037>.

Gomariz-Zilber, E., Jeune, B., and Thomas-Orillard, M. (1998). Limiting conditions of the horizontal transmission of the *Drosophila C* virus in its host (*D. melanogaster*). *Acta Oecologica* 19, 125–137. [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(98\)80016-7](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(98)80016-7).

Grether, G.F. (2005). Environmental change, phenotypic plasticity, and genetic compensation. *Am. Nat.* 166, E115–E123. .

Gross, J., and Bhattacharya, D. (2010). Uniting sex and eukaryote origins in an emerging oxygenic world. *Biol. Direct* 5, 1–20. .

Guichard, C., Moreau, R., Pessayre, D., Epperson, T.K., and Krause, K.-H. (2008). NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem. Soc. Trans.* 36, 920–929. .

Guio, L., Barrón, M.G., and González, J. (2014). The transposable element Bari-Jheh mediates oxidative stress response in *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 23, 2020–2030. <https://doi.org/10.1111/mec.12711>.

Gulraiz, F., Bellinghausen, C., Bruggeman, C.A., and Stassen, F.R. (2015). *Haemophilus influenzae* increases the susceptibility and inflammatory response of airway epithelial cells to viral infections. *FASEB J.* 29, 849–858. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254359>.

Gupta, V., Vasanthakrishnan, R.B., Siva-Jothy, J., Monteith, K.M., Brown, S.P., and Vale, P.F. (2017). The route of infection determines *Wolbachia* antibacterial protection in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0809>.

Ha, E.-M., Oh, C.-T., Ryu, J.-H., Bae, Y.-S., Kang, S.-W., Jang, I., Brey, P.T., and Lee, W.-J. (2005a). An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev. Cell* 8, 125–132. .

Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., and Lee, W.J. (2005b). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* (80-.). 310, 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.1117311>.

- Haine, E.R. (2008). Symbiont-mediated protection. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 353–361. .
- Hamilton, P.T., Peng, F., Boulanger, M.J., and Perlman, S.J. (2016). A ribosome-inactivating protein in a *Drosophila* defensive symbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 350–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518648113>.
- Hanada, S., Pirzadeh, M., Carver, K.Y., and Deng, J.C. (2018). Respiratory viral infection-induced microbiome alterations and secondary bacterial pneumonia. *Front. Immunol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02640>.
- Hancock, P.A., Sinkins, S.P., and Godfray, H.C.J. (2011). Strategies for introducing *Wolbachia* to reduce transmission of mosquito-borne diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1024. .
- Hannah, A.M. (1949). Radiation mutations involving the cut locus in *Drosophila*. In *Proceedings of the 8th International Congress of Genetics (Hereditas Suppl Vol.)*. Stockholm, pp. 588–589.
- Hansen, A.K., Vorburger, C., and Moran, N.A. (2012). Genomic basis of endosymbiont-conferred protection against an insect parasitoid. *Genome Res.* 22, 106–114. <https://doi.org/10.1101/gr.125351.111>.
- Hedges, L.M., and Johnson, K.N. (2008). Induction of host defence responses by *Drosophila* C virus. *J. Gen. Virol.* 89, 1497–1501. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83684-0>.
- Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* (80-.). 322, 702. <https://doi.org/10.1126/science.1162418>.
- Hedges, L.M., Yamada, R., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2012). The small interfering RNA pathway is not essential for *wolbachia*-mediated antiviral protection in *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6773–6776. <https://doi.org/10.1128/AEM.01650-12>.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>.
- Henry, M., Becher, M.A., Osborne, J.L., Kennedy, P.J., Aupinel, P., Bretagnolle, V., Brun, F., Grimm, V., Horn, J., and Requier, F. (2017). Predictive systems models can help elucidate bee declines driven by multiple combined stressors. *Apidologie* 48, 328–339. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0476-0>.
- Hertig, M., and Wolbach, S.B. (1924). Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *J. Med. Res.* 44, 329-374.7. .
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>.
- Hoffmann, A.A., Hercus, M., and Dagher, H. (1998). Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148, 221–231. .
- Hoffmann, A.A., Montgomery, B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P.H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y.S., Dong, Y., et al. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476, 454–459. <https://doi.org/10.1038/nature10356>.
- Hoffmann, A.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Callahan, A.G., Phillips, B.L., Billington, K., Axford, J.K., Montgomery, B., Turley, A.P., and O'Neill, S.L. (2014). Stability of the wMel *Wolbachia* Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003115>.

Hoffmann, A.A., Ross, P.A., and Rašić, G. (2015). *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. *Evol. Appl.* 8, 751–768. .

Hopkins, S.R., Wojdak, J.M., and Belden, L.K. (2017). Defensive Symbionts Mediate Host–Parasite Interactions at Multiple Scales. *Trends Parasitol.* 33, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.003>.

Hosamani, R., and Muralidhara (2013). Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 83, 25–40. .

Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.Y., and Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 769–774. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107>.

Hughes, G.L., Vega-Rodriguez, J., Xue, P., and Rasgon, J.L. (2012). *Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1491–1495. <https://doi.org/10.1128/AEM.06751-11>.

Hurst, G.D.D., Jigging, F.M., Von Der Schulenburg, J.H.G., Bertrand, D., West, S.A., Goriacheva, I.I., Zakharov, I.A., Werren, J.H., Stouthamer, R., and Majerus, M.E.N. (1999). Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 266, 735–740. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0698>.

Hussain, M., Frentiu, F.D., Moreira, L.A., O'Neill, S.L., and Asgari, S. (2011). *Wolbachia* uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9250–9255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105469108>.

Huszar, T., and Imler, J.L. (2008a). Chapter 6 *Drosophila* Viruses and the Study of Antiviral Host-Defense. *Adv. Virus Res.* 72, 227–265. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00406-5).

Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., and Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5354–5359. .

Ijichi, N., Kondo, N., Matsumoto, R., Shimada, M., Ishikawa, H., and Fukatsu, T. (2002). Internal Spatiotemporal Population Dynamics of Infection with Three *Wolbachia* Strains in the Adzuki Bean Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Am. Soc. Microbiol.* 68, 4074–4080. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4074>.

IUCN (2021). The IUCN Red List of Threatened Species.

Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S.N., Boelio, L.M., and Perlman, S.J. (2010). Adaptation via symbiosis: Recent spread of a drosophila defensive symbiont. *Science* (80-.). 329, 212–215. <https://doi.org/10.1126/science.1188235>.

Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 9, 393–405. .

Jin, C., Ren, X., and Rasgon, J.L. (2009). The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3373–3376. .

Johnson, K.N., and Christian, P.D. (1998). The novel genome organization of the insect picorna-like virus *Drosophila C virus* suggests this virus belongs to a previously undescribed virus family. *J. Gen. Virol.* 79, 191–203. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-1-191>.

- Jones, E.O., White, A., and Boots, M. (2010). The evolutionary implications of conflict between parasites with different transmission modes. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 64, 2408–2416. .
- Jousset, F.X., Bergoin, M., and Revet, B. (1977). Characterization of the *Drosophila* C virus. *J. Gen. Virol.* 34, 269–283. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-2-269>.
- Jumbo-Lucioni, P.P., Hopson, M.L., Hang, D., Liang, Y., Jones, D.P., and Fridovich-Keil, J.L. (2013). Oxidative stress contributes to outcome severity in a *Drosophila melanogaster* model of classic galactosemia. *Dis. Model. Mech.* 6, 84–94. .
- Kaltenpoth, M., Roeser-Mueller, K., Koehler, S., Peterson, A., Nechitaylo, T.Y., Stubblefield, J.W., Herzner, G., Seger, J., and Strohm, E. (2014). Partner choice and fidelity stabilize coevolution in a Cretaceous-age defensive symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6359–6364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400457111>.
- Kambris, Z., Cook, P.E., Phuc, H.K., and Sinkins, S.P. (2009). Immune activation by life-shortening *wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* (80-.). 326, 134–136. <https://doi.org/10.1126/science.1177531>.
- Kambris, Z., Blagborough, A.M., Pinto, S.B., Blagrove, M.S.C., Godfray, H.C.J., Sinden, R.E., and Sinkins, S.P. (2010). *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001143>.
- Kaur, R., Martinez, J., Rota-Stabelli, O., Jiggins, F.M., and Miller, W.J. (2020). Age, tissue, genotype and virus infection regulate *Wolbachia* levels in *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 29, 2063–2079. <https://doi.org/10.1111/mec.15462>.
- Kemp, C., and Imler, J.L. (2009). Antiviral immunity in *drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.007>.
- Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A., and Denison, R.F. (2003). Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature* 425, 78–81. .
- Kim, S.H., and Lee, W.J. (2014). Role of DUOX in gut inflammation: Lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00116>.
- King, L.A., and Moore, N.F. (1988). Evidence for the presence of a genome-linked protein in two insect picornaviruses, cricket paralysis and *Drosophila* C viruses. *FEMS Microbiol. Lett.* 50, 41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02908.x>.
- Kingsolver, M.B., and Hardy, R.W. (2012). Making connections in insect innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18639–18640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216736109>.
- Kingsolver, M.B., Huang, Z., and Hardy, R.W. (2013). Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* 425, 4921–4936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.006>.
- Koehler, S., Doubský, J., and Kaltenpoth, M. (2013). Dynamics of symbiont-mediated antibiotic production reveal efficient long-term protection for beewolf offspring. *Front. Zool.* 10. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-3>.
- Koga, R., Tsuchida, T., and Fukatsu, T. (2003). Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 270, 2543–2550. .
- Koga, R., Tsuchida, T., Sakurai, M., and Fukatsu, T. (2007). Selective elimination of aphid endosymbionts: effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 229–239. .

- Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., and Soma, G.-I. (2009). ROS and innate immunity. *Anticancer Res.* 29, 817–821. .
- Kozek, W.J., and Rao, R.U. (2007). The discovery of *Wolbachia* in arthropods and nematodes—A historical perspective. In *Wolbachia: A Bug's Life in Another Bug*, (Karger Publishers), pp. 1–14.
- Kremer, N., Voronin, D., Charif, D., Mavingui, P., Mollereau, B., and Vavre, F. (2009). *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000630>.
- Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Gavory, F., Wincker, P., Mavingui, P., and Vavre, F. (2012). Influence of *Wolbachia* on host gene expression in an obligatory symbiosis. *BMC Microbiol.* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S7>.
- Kuraishi, T., Hori, A., and Kurata, S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front. Physiol.* 4, 375. .
- Lambrechts, L., Fellous, S., and Koella, J.C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* 22, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.008>.
- Latef, A.A.H.A., Hashem, A., Rasool, S., Abd-Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Egamberdieva, D., Jan, S., Anjum, N.A., and Ahmad, P. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: A review. *J. Plant Biol.* 59, 407–426. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0237-7>.
- Lautié-Harivel, N. (1992). *Drosophila* C virus cycle during the development of two *Drosophila melanogaster* strains (Charolles and Champetières) after larval contamination by food. *Biol. Cell* 76, 151–157. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(92\)90207-H](https://doi.org/10.1016/0248-4900(92)90207-H).
- Lee, K.-A., Kim, B., Bhin, J., Kim, D.H., You, H., Kim, E.-K., Kim, S.-H., Ryu, J.-H., Hwang, D., and Lee, W.-J. (2015a). Bacterial uracil modulates *Drosophila* DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell Host Microbe* 17, 191–204. .
- Lee, K.A., Kim, S.H., Kim, E.K., Ha, E.M., You, H., Kim, B., Kim, M.J., Kwon, Y., Ryu, J.H., and Lee, W.J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *drosophila*. *Cell* 153, 797–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009>.
- Lee, K.A., Kim, B., Bhin, J., Kim, D.H., You, H., Kim, E.K., Kim, S.H., Ryu, J.H., Hwang, D., and Lee, W.J. (2015b). Bacterial uracil modulates *drosophila* DUOX-dependent Gut immunity via hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell Host Microbe* 17, 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.012>.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Li, Y.-Y., Floate, K.D., Fields, P.G., and Pang, B.-P. (2014). Review of treatment methods to remove *Wolbachia* bacteria from arthropods. *Symbiosis* 62, 1–15. .
- Lin, D., and Koskella, B. (2015). Friend and foe: Factors influencing the movement of the bacterium *Helicobacter pylori* along the parasitism-mutualism continuum. *Evol. Appl.* 8, 9–22. <https://doi.org/10.1111/eva.12231>.
- Lindsey, A.R.I., Bhattacharya, T., Newton, I.L.G., and Hardy, R.W. (2018). Conflict in the intracellular lives of endosymbionts and viruses: A mechanistic look at *Wolbachia*-mediated pathogen-blocking. *Viruses* 10, 1–29. <https://doi.org/10.3390/v10040141>.
- de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.M., et al. (2018). Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat. Commun.* 9.

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>.

Lu, P., Bian, G., Pan, X., and Xi, Z. (2012). *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754>.

Lu, W.-N., Chiu, M.-C., and Kuo, M.-H. (2014). Host life stage-and temperature-dependent density of the symbiont *Buchnera aphidicola* in a subtropical pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) population. *J. Asia. Pac. Entomol.* 17, 537–541. .

Madhusoodanan, J. (2019). News Feature: Do hosts and their microbes evolve as a unit? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 14391–14394. .

Magalon, H., Nidelet, T., Martin, G., and Kaltz, O. (2010). Host growth conditions influence experimental evolution of life history and virulence of a parasite with vertical and horizontal transmission. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 64, 2126–2138. .

Magwire, M.M., Fabian, D.K., Schweyen, H., Cao, C., Longdon, B., Bayer, F., and Jiggins, F.M. (2012). Genome-Wide Association Studies Reveal a Simple Genetic Basis of Resistance to Naturally Coevolving Viruses in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003057>.

Maistrenko, O.M., Serga, S. V, Vaiserman, A.M., and Kozeretska, I.A. (2015). Effect of *Wolbachia* infection on aging and longevity-associated genes in *Drosophila*. In *Life Extension*, (Springer), pp. 83–104.

Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y.S., Miller, W.J., Bourtzis, K., Teixeira, L., and Jiggins, F.M. (2014). Symbionts Commonly Provide Broad Spectrum Resistance to Viruses in Insects: A Comparative Analysis of *Wolbachia* Strains. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004369>.

Martinez, J., Ok, S., Smith, S., Snoeck, K., Day, J.P., and Jiggins, F.M. (2015). Should Symbionts Be Nice or Selfish? Antiviral Effects of *Wolbachia* Are Costly but Reproductive Parasitism Is Not. *PLoS Pathog.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005021>.

Martinez, J., Cogni, R., Cao, C., Smith, S., Illingworth, C.J.R., and Jiggins, F.M. (2016). Addicted? Reduced host resistance in populations with defensive symbionts. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0778>.

Martinez, J., Tolosana, I., Ok, S., Smith, S., Snoeck, K., Day, J.P., and Jiggins, F.M. (2017). Symbiont strain is the main determinant of variation in *Wolbachia*-mediated protection against viruses across *Drosophila* species. *Mol. Ecol.* 26, 4072–4084. <https://doi.org/10.1111/mec.14164>.

Martinez, J., Bruner-Montero, G., Arunkumar, R., Smith, S.C.L., Day, J.P., Longdon, B., and Jiggins, F.M. (2019). Virus evolution in *wolbachia*-infected drosophila. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2117>.

Martins, N.E., Faria, V.G., Nolte, V., Schlötterer, C., Teixeira, L., Sucena, É., and Magalhães, S. (2014). Correction: Host adaptation to viruses relies on few genes with different cross-resistance properties (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2014) 111, (5938-5943) 10.1073/pnas.1400378111). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418561111>.

Mathé-Hubert, H., Kaech, H., Hertaeg, C., Jaenike, J., and Vorburger, C. (2019). Nonrandom associations of maternally transmitted symbionts in insects: The roles of drift versus biased cotransmission and selection. *Mol. Ecol.* 28, 5330–5346. <https://doi.org/10.1111/mec.15206>.

May, G., and Nelson, P. (2014). Defensive mutualisms: Do microbial interactions within hosts

drive the evolution of defensive traits? *Funct. Ecol.* 28, 356–363. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12166>.

May, R.M., and Anderson, R.M. (1979). Population biology of infectious diseases: Part II. *Nature* 280, 455–461. <https://doi.org/10.1038/280455a0>.

Mayoral, J.G., Etebari, K., Hussain, M., Khromykh, A.A., and Asgari, S. (2014). *Wolbachia* infection modifies the profile, shuttling and structure of microRNAs in a mosquito cell line. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096107>.

Mayr, E. (1982). *The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance* (Harvard University Press).

McFall-Ngai, M., Nyholm, S. V, and Castillo, M.G. (2010). The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes–Vibrio fischeri* symbiosis. In *Seminars in Immunology*, (Elsevier), pp. 48–53.

McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N., and O'Neill, S.L. (2001). *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 2565–2570. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1839>.

McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N., and O'Neill, S.L. (2002). *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2918–2923. .

McMeniman, C.J., and O'Neill, S.L. (2010). A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e748. .

McMeniman, C.J., Lane, A.M., Fong, A.W.C., Voronin, D.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Yamada, R., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2008). Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6963–6969. .

McMeniman, C.J., Lane, R. V., Cass, B.N., Fong, A.W.C., Sidhu, M., Wang, Y.F., and O'Neill, S.L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* (80-.). 323, 141–144. <https://doi.org/10.1126/science.1165326>.

Mehdi, S.H., and Qamar, A. (2013). Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Sci.* 134, 355–365. .

Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>.

Merçot, H., and Charlat, S. (2004). *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Drosoph. Melanogaster, Drosoph. Simulans So Similar, So Differ.* 51–59. .

Merkling, S.H., and van Rij, R.P. (2013). Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J. Insect Physiol.* 59, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.004>.

Metcalf, C.J.E., and Koskella, B. (2019). Protective microbiomes can limit the evolution of host pathogen defense. *Evol. Lett.* 3, 534–543. <https://doi.org/10.1002/evl3.140>.

Miller, W.J., and Riegler, M. (2006). Evolutionary dynamics of *wAu*-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 826–835. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.826-835.2006>.

Min, K.T., and Benzer, S. (1997). *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10792–

10796. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10792>.

Molloy, J.C., Sommer, U., Viant, M.R., and Sinkins, S.P. (2016). *Wolbachia* modulates lipid metabolism in *Aedes albopictus* mosquito cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3109–3120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00275-16>.

Mondotte, J.A., and Saleh, M.C. (2018). Antiviral Immune Response and the Route of Infection in *Drosophila melanogaster* (Elsevier Inc.).

Mondotte, J.A., Gausson, V., Frangeul, L., Blanc, H., Lambrechts, L., and Saleh, M.C. (2018). Immune priming and clearance of orally acquired RNA viruses in *Drosophila*. *Nat. Microbiol.* 3, 1394–1403. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0265-9>.

Moné, Y., Monnin, D., and Kremer, N. (2014). The oxidative environment: a mediator of interspecies communication that drives symbiosis evolution Review. *Proc. R Soc. Lond. B* 281, 20133112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.3112>.

Monnin, D., Kremer, N., Berny, C., Henri, H., Dumet, A., Voituron, Y., Desouhant, E., and Vavre, F. (2016). Influence of oxidative homeostasis on bacterial density and cost of infection in *Drosophila/Wolbachia* symbioses. *J. Evol. Biol.* 29, 1211–1222. <https://doi.org/10.1111/jeb.12863>.

Monsanto-Hearne, V., and Johnson, K.N. (2018). *Wolbachia*-mediated protection of *Drosophila melanogaster* against systemic infection with its natural viral pathogen *Drosophila C* virus does not involve changes in levels of highly abundant miRNAs. *J. Gen. Virol.* 99, 827–831. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001064>.

Montllor, C.B., Maxmen, A., and Purcell, A.H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* 27, 189–195. .

Moore, A.J. (1997). Indirect genetic effects of social interactions. *Evolution* (N. Y.) 51, 1352–1362. .

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., et al. (2009). A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139, 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>.

Mousson, L., Martin, E., Zouache, K., Madec, Y., Mavingui, P., and Failloux, A.B. (2010). *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Mol. Ecol.* 19, 1953–1964. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04606.x>.

Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., and Failloux, A.B. (2012). The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>.

Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M., and Vavre, F. (2003). Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Mol. Ecol.* 12, 3459–3465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02015.x>.

Mouton, L., Dedeine, F., Henri, H., Boulétreau, M., Profizi, N., and Vavre, F. (2004). Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics* 168, 181–189. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026716>.

Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M., and Vavre, F. (2006). Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology* 132, 49–56. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008723>.

Mouton, L., Henri, H., Charif, D., Boulétreau, M., and Vavre, F. (2007). Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis.

Biol. Lett. 3, 210–213. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0590>.

Myllymäki, H., and Rämet, M. (2014). JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scand. J. Immunol.* 79, 377–385. <https://doi.org/10.1111/sji.12170>.

Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.* 68, 450–456. .

Nathan, C., and Cunningham-Bussell, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 349–361. .

Newton, I.L.G., Savytsky, O., and Sheehan, K.B. (2015). *Wolbachia* Utilize Host Actin for Efficient Maternal Transmission in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 11, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004798>.

Nikoh, N., Hosokawa, T., Moriyama, M., Oshima, K., Hattori, M., and Fukatsu, T. (2014). Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10257–10262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409284111>.

O'Fallon, B. (2008). Population structure, levels of selection, and the evolution of intracellular symbionts. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 62, 361–373. .

O'Neill, S.L., Hoffmann, A., and Werren, J. (1997). Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction (Oxford University Press).

Ogunlade, S.T., Meehan, M.T., Adekunle, A.I., Rojas, D.P., Adegboye, O.A., and McBryde, E.S. (2021). A review: *Aedes*-borne arboviral infections, controls and *wolbachia*-based strategies. *Vaccines* 9, 1–23. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010032>.

Oliver, K.M., and Moran, N.A. (2009). Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis. *Defensive Mutual. Microb. Symbiosis* <https://doi.org/10.1201/9781420069327>.

Oliver, K.M., Russell, J.A., Morant, N.A., and Hunter, M.S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1803–1807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100>.

Oliver, K.M., Campos, J., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2008). Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 293–299. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1192>.

Osborne, S.E., Leong, Y.S., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2009). Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000656>.

Osborne, S.E., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2012). Antiviral protection and the importance of *Wolbachia* density and: Tissue tropism in *Drosophila simulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6922–6929. <https://doi.org/10.1128/AEM.01727-12>.

Osei-Amo, S., Hussain, M., O'Neill, S.L., and Asgari, S. (2012). *Wolbachia*-Induced *aae*-miR-12 miRNA Negatively Regulates the Expression of MCT1 and MCM6 Genes in *Wolbachia*-Infected Mosquito Cell Line. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050049>.

Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A.S., and Xi, Z. (2012). PNAS Plus: *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E23–E31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>.

Le Pape, S. (2012). EasyqpcR: EasyqpcR for easy analysis of real-time PCR data at IRTOMIT-INSERM U1082.

- Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.B., and Walker, P.J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 18915–18920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205231109>.
- Paraskevopoulos, C., Bordenstein, S.R., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., and Bourtzis, K. (2006). Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Curr. Microbiol.* *53*, 388–395. .
- Parker, B.J., Hrček, J., McLean, A.H.C., Brisson, J.A., and Godfray, H.C.J. (2021). Intraspecific variation in symbiont density in an insect–microbe symbiosis. *Mol. Ecol.* *30*, 1559–1569. <https://doi.org/10.1111/mec.15821>.
- Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P., and Boulianne, G.L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat. Genet.* *19*, 171–174. .
- Parkinson, J.F., Gobin, B., and Hughes, W.O.H. (2017). The more, the merrier? Obligate symbiont density changes over time under controlled environmental conditions, yet holds no clear fitness consequences. *Physiol. Entomol.* *42*, 163–172. .
- Péan, C.B., and Dionne, M.S. (2014). Intracellular infections in *Drosophila melanogaster*: host defense and mechanisms of pathogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* *42*, 57–66. .
- Peller, C., Bacon, E., Bucheger, J., and Blumenthal, E. (2009). Defective gut function in drop-dead mutant *Drosophila* *Cassandra*. *J. Insect Physiol.* *55*, 834–839. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.011>.Defective.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* *29*, e45. .
- Pietri, J.E., DeBruhl, H., and Sullivan, W. (2016). The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen* *5*, 923–936. <https://doi.org/10.1002/mbo3.390>.
- Pimentel, A.C., Cesar, C.S., Martins, M., and Cogni, R. (2021). The Antiviral Effects of the Symbiont Bacteria *Wolbachia* in Insects. *Front. Immunol.* *11*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.626329>.
- Plus, N., Croizier, G., Jousset, F.X., and David, J. (1975). Picornaviruses of laboratory and wild *Drosophila melanogaster*: geographical distribution and serotypic composition. *Ann. Microbiol. (Paris)*. *126*, 107–117. .
- Rainey, S.M., Shah, P., Kohl, A., and Dietrich, I. (2014). Understanding the *wolbachia*-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: Progress and challenges. *J. Gen. Virol.* *95*, 517–530. <https://doi.org/10.1099/vir.0.057422-0>.
- Ramoneda, J., Roux, J.J. Le, Frossard, E., Frey, B., and Gamper, H.A. (2020). Geographical patterns of root nodule bacterial diversity in cultivated and wild populations of a woody legume crop. *FEMS Microbiol. Ecol.* *96*, fiae145. .
- Rances, E., Johnson, T.K., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Zakir, T., Warr, C.G., and O'Neill, S.L. (2013). The Toll and Imd Pathways Are Not Required for *Wolbachia*-Mediated Dengue Virus Interference. *J. Virol.* *87*, 11945–11949. <https://doi.org/10.1128/jvi.01522-13>.
- Rancès, E., Ye, Y.H., Woolfit, M., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2012). The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Pathog.* *8*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548>.
- Ratzka, C., Gross, R., and Feldhaar, H. (2013). Gene expression analysis of the endosymbiont-bearing midgut tissue during ontogeny of the carpenter ant *Camponotus*

floridanus. *J. Insect Physiol.* *59*, 611–623. .

Ravikumar, H., Ramachandraswamy, N., Sampathkumar, S., Prakash, B.M., Huchesh, H.C., Uday, J., and Puttaraju, H.P. (2010). A preliminary survey for *Wolbachia* and bacteriophage WO infections in Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Trop. Biomed.* *27*, 384–393. .

Ray, P.D., Huang, B.W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* *24*, 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.

Revealed, P., Screen, G.R., White, P.M., Serbus, L.R., Debec, A., Codina, A., Bray, W., Guichet, A., Lokey, R.S., and Sullivan, W. (2017). Reliance of *Wolbachia* on High Rates of Host Proteolysis Revealed by a Genome-Wide RNAi Screen of *Drosophila* Cells. *Genetics* *205*, 1473–1488. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.198903/-/DC1.1>.

Reynolds, K.T., Thomson, L.J., and Hoffmann, A.A. (2003). The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain popcorn in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *164*, 1027–1034. .

Rigaud, T., Moreau, J., and Juchault, P. (1999). *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: Sex ratio distortion and effect on fecundity. *Heredity (Edinb.)* *83*, 469–475. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885990>.

Van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., and Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* *20*, 2985–2995. <https://doi.org/10.1101/gad.1482006>.

Rocklöv, J., and Dubrow, R. (2020). Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. *Nat. Immunol.* *21*, 479–483. .

Rodríguez-Haas, B., Finney, L., Vogt, S., González-Melendi, P., Imperial, J., and González-Guerrero, M. (2013). Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules. *Metallomics* *5*, 1247–1253. <https://doi.org/10.1039/c3mt00060e>.

Rohrscheib, C.E., Frentiu, F.D., Horn, E., Ritchie, F.K., van Swinderen, B., Weible, M.W., O'Neill, S.L., and Brownlie, J.C. (2016). Intensity of Mutualism Breakdown Is Determined by Temperature Not Amplification of *Wolbachia* Genes. *PLoS Pathog.* *12*, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005888>.

Ross, P.A., Endersby, N.M., Yeap, H.L., and Hoffmann, A.A. (2014). Larval competition extends developmental time and decreases adult size of wMelPop *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *91*, 198. .

Ross, P.A., Endersby, N.M., and Hoffmann, A.A. (2016). Costs of three *Wolbachia* infections on the survival of *Aedes aegypti* larvae under starvation conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *10*, e0004320. .

Rottschaefter, S.M., and Lazzaro, B.P. (2012). No effect of *Wolbachia* on resistance to intracellular infection by pathogenic bacteria in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040500>.

Roughgarden, J., Lamm, E., and Shavit, A. (2017). Model of holobiont population dynamics and evolution: a preliminary sketch. *Landscapes Collect. Life Sci.* 325–350. .

Russell, J.A., and Moran, N.A. (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *273*, 603–610. .

Ryu, J.-H., Kim, C.-H., and Yoon, J.-H. (2010). Innate immune responses of the airway epithelium. *Mol. Cells* *30*, 173–183. .

- Rzezniczak, T.Z., Douglas, L.A., Watterson, J.H., and Merritt, T.J.S. (2011). Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Anal. Biochem.* 419, 345–347. .
- Salamin, N., Wüest, R.O., Lavergne, S., Thuiller, W., and Pearman, P.B. (2010). Assessing rapid evolution in a changing environment. *Trends Ecol. Evol.* 25, 692–698. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.09.009>.
- Salas, J.T., and Chang, T.L. (2014). Microbiome in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Lab. Med.* 34, 733–745. .
- Sansone, C.L., and Blumenthal, E.M. (2012). Developmental expression of drop-dead is required for early adult survival and normal body mass in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 690–698. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.06.002>.
- Sansone, C.L., Cohen, J., Yasunaga, A., Xu, J., Osborn, G., Subramanian, H., Gold, B., Buchon, N., and Cherry, S. (2015). Microbiota-dependent priming of antiviral intestinal immunity in *Drosophila*. *Cell Host Microbe* 18, 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.010>.
- Sansonetti, P.J., and Medzhitov, R. (2009). Learning tolerance while fighting ignorance. *Cell* 138, 416–420. .
- Saridaki, A., Sapountzis, P., Harris, H.L., Batista, P.D., Biliske, J.A., Pavlikaki, H., Oehler, S., Savakis, C., Braig, H.R., and Bourtzis, K. (2011). *Wolbachia* prophage DNA adenine methyltransferase genes in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *PLoS One* 6, e19708. .
- Sawyer, S.J., and Muscatine, L. (2001). Cellular mechanisms underlying temperature-induced bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *J. Exp. Biol.* 204, 3443–3456. .
- Schippers, J.H.M., Nguyen, H.M., Lu, D., Schmidt, R., and Mueller-Roeber, B. (2012). ROS homeostasis during development: An evolutionary conserved strategy. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3245–3257. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1092-4>.
- Schneider, J., and Imler, J.L. (2021). Sensing and signalling viral infection in drosophila. *Dev. Comp. Immunol.* 117, 103985. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103985>.
- Schultz, M.J., Isern, S., Michael, S.F., Corley, R.B., Connor, J.H., and Frydman, H.M. (2017). Variable Inhibition of Zika Virus Replication by Different *Wolbachia* Strains in Mosquito Cell Cultures. *J. Virol.* 91, 1–13. <https://doi.org/10.1128/jvi.00339-17>.
- Schupp, E.W. (1993). Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal by animals. *Vegetatio* 107, 15–29. .
- Scott, J.C., Brackney, D.E., Campbell, C.L., Bondu-Hawkins, V., Hjelle, B., Ebel, G.D., Olson, K.E., and Blair, C.D. (2010). Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000848>.
- Serbus, L.R., and Sullivan, W. (2007). A cellular basis for *Wolbachia* recruitment to the host germline. *PLoS Pathog.* 3, 1930–1937. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030190>.
- Shapira, M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* 31, 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006>.
- Sheehan, K.B., Martin, M., Lesser, C.F., Isberg, R.R., and Newton, I.L.G. (2016). Identification and characterization of a candidate *Wolbachia pipientis* type IV effector that interacts with the actin cytoskeleton. *MBio* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00622-16>.

Shuster, S.M., Lonsdorf, E. V., Wimp, G.M., Bailey, J.K., and Whitham, T.G. (2006). Community Heritability Measures the Evolutionary Consequences of Indirect Genetic Effects on Community Structure. *Evolution* (N. Y). *60*, 991. <https://doi.org/10.1554/05-121.1>.

Silverstein, R.N., Cunning, R., and Baker, A.C. (2015). Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Glob. Chang. Biol.* *21*, 236–249. <https://doi.org/10.1111/gcb.12706>.

Sinkins, S.P., and O'Neill, S.L. (2000). *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations.

Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Sacco, B. Di, Damiani, G., and Genchi, C. (1995). Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* *74*, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02494-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02494-8).

Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J., and Raghavan, R. (2015). A Coxiella-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol. Evol.* *7*, 831–838. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv016>.

Souza-Neto, J.A., Sim, S., and Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17841–17846. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905006106>.

Sperling, E.A., Frieder, C.A., Raman, A. V, Girguis, P.R., Levin, L.A., and Knoll, A.H. (2013). Oxygen, ecology, and the Cambrian radiation of animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13446–13451. .

Stevanovic, A.L., and Johnson, K.N. (2015). Infectivity of drosophila C virus following oral delivery in drosophila larvae. *J. Gen. Virol.* *96*, 1490–1496. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000068>.

Stevanovic, A.L., Arnold, P.A., and Johnson, K.N. (2015). *Wolbachia*-mediated antiviral protection in *Drosophila* larvae and adults following oral infection Short title: *Wolbachia* antiviral protection in larvae and. *Appl. Env. Microbiol.* *81*, 8215–8223. <https://doi.org/10.1128/AEM.02841-15>.

Sudakaran, S., Kost, C., and Kaltenpoth, M. (2017). Symbiont Acquisition and Replacement as a Source of Ecological Innovation. *Trends Microbiol.* *25*, 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014>.

Sumi, T., Miura, K., and Miyatake, T. (2017). *Wolbachia* density changes seasonally amongst populations of the pale grass blue butterfly, *Zizeeria maha* (Lepidoptera: Lycaenidae). *PLoS One* *12*, e0175373. .

Sun, L. V, Foster, J.M., Tzertzinis, G., Ono, M., Bandi, C., Slatko, B.E., and O'Neill, S.L. (2001). Determination of *Wolbachia* genome size by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* *183*, 2219–2225. .

Tafesh-Edwards, G., and Eleftherianos, I. (2020). *Drosophila* immunity against natural and nonnatural viral pathogens. *Virology* *540*, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.12.001>.

Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* *6*, e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002>.

Terradas, G., and McGraw, E.A. (2017). *Wolbachia*-mediated virus blocking in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Curr. Opin. Insect Sci.* *22*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.005>.

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., and Lloyd, E.A. (2016). Getting the hologenome concept

right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *Msystems* 1, e00028-16. .

Thomas, F., Guegan, J.-F., Renaud, F., and Guegan, J.-F. (2005). *Parasitism and ecosystems* (Oxford University Press on Demand).

Tipton, L., Darcy, J.L., and Hynson, N.A. (2019). A developing symbiosis: Enabling cross-talk between ecologists and microbiome scientists. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00292>.

Toby Kiers, E., Palmer, T.M., Ives, A.R., Bruno, J.F., and Bronstein, J.L. (2010). Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecol. Lett.* 13, 1459–1474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01538.x>.

Tolia, N.H., and Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the Argonautes. *Nat. Chem. Biol.* 3, 36–43. <https://doi.org/10.1038/nchembio848>.

Torri, A., Mongelli, V., Mondotte, J.A., and Saleh, M.C. (2020). Viral Infection and Stress Affect Protein Levels of Dicer 2 and Argonaute 2 in *Drosophila melanogaster*. *Front. Immunol.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00362>.

Tyssen, D., Wang, Y., Hayward, J.A., Agius, P.A., Delong, K., Aldunate, M., Ravel, J., Moench, T.R., Cone, R.A., and Tachedjian, G. (2018). Anti-HIV-1 Activity of Lactic Acid in Human Cervicovaginal Fluid. *MSphere* 3, e00055-18. .

Ulrich, J.N., Beier, J.C., Devine, G.J., and Hugo, L.E. (2016). Heat sensitivity of wMel *Wolbachia* during *Aedes aegypti* development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004873. .

Valencia, J.I., and Muller, H.J. (1949). The mutational potentialities of some individual loci in *Drosophila*. In *Proceedings of the 8th International Congress of Genetics (Hereditas Suppl Vol.)*, pp. 681–684.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M.M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. .

Vavre, F., and Charlat, S. (2012). Making (good) use of *Wolbachia*: What the models say. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.03.005>.

Veneti, Z., Clark, M.E., Karr, T.L., Savakis, C., and Bourtzis, K. (2004). Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5366–5372. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5366-5372.2004>.

Villegas-Ospina, S., Merritt, D.J., and Johnson, K.N. (2021). Physical and Chemical Barriers in the Larval Midgut Confer Developmental Resistance to Virus Infection in *Drosophila*. *Viruses* 13, 894. <https://doi.org/10.3390/v13050894>.

Vorburger, C., Sandrock, C., Gousskov, A., Castañeda, L.E., and Ferrari, J. (2009). Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host-parasitoid interaction. *Evolution (N. Y.)*. 63, 1439–1450. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00660.x>.

Walker, T., Johnson, P.H., Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F.D., McMeniman, C.J., Leong, Y.S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., et al. (2011). The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476, 450–455. <https://doi.org/10.1038/nature10355>.

Wang, J., Wu, Y., Yang, G., and Aksoy, S. (2009). Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12133–12138. .

- Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., and Ding, S.W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* (80-.). 312, 452–454. <https://doi.org/10.1126/science.1125694>.
- Webster, J.P. (2007). The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: Playing cat and mouse. *Schizophr. Bull.* 33, 752–756. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbl073>.
- Webster, C.L., Waldron, F.M., Robertson, S., Crowson, D., Ferrari, G., Quintana, J.F., Brouqui, J.-M., Bayne, E.H., Longdon, B., and Buck, A.H. (2015). The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 13, e1002210. .
- Weeks, A.R., and Breeuwer, J.A.J. (2001). *Wolbachia*–induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 268, 2245–2251. .
- Weeks, A.R., Tracy Reynolds, K., and Hoffmann, A.A. (2002). *Wolbachia* dynamics and host effects: What has (and has not) been demonstrated? *Trends Ecol. Evol.* 17, 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02480-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02480-1).
- Weldon, S.R., Strand, M.R., and Oliver, K.M. (2013). Phage loss and the breakdown of a defensive symbiosis in aphids. *Proc. Biol. Sci.* 280, 20122103. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2103>.
- Wernegreen, J.J., and Wheeler, D.E. (2009). Remaining flexible in old alliances: Functional plasticity in constrained mutualisms. *DNA Cell Biol.* 28, 371–381. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0872>.
- Werner, G.D.A., and Kiers, E.T. (2015). Partner selection in the mycorrhizal mutualism. *New Phytol.* 205, 1437–1442. <https://doi.org/10.1111/nph.13113>.
- Werren, J.H. (1997). BIOLOGY OF *WOLBACHIA*. 1–23. .
- Werren, J.H., Baldo, L., and Clark, M.E. (2008). *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>.
- Wesołowska, W., and Wesołowski, T. (2014). Do *Leucochloridium* sporocysts manipulate the behaviour of their snail hosts? *J. Zool.* 292, 151–155. <https://doi.org/10.1111/jzo.12094>.
- Westermann, A.J., Barquist, L., and Vogel, J. (2017). Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog.* 13, e1006033. .
- Wilkinson, T.L., and Ishikawa, H. (2000). Injection of essential amino acids substitutes for bacterial supply in aposymbiotic pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). *Entomol. Exp. Appl.* 94, 85–91. .
- William, J., and Ballard, O. (2000). Comparative genomics of mitochondrial DNA *drosophila simulans*. *J. Mol. Evol.* 51, 64–75. <https://doi.org/10.1007/s002390010067>.
- Williams, B., Landay, A., and Presti, R.M. (2016). Microbiome alterations in HIV infection a review. *Cell. Microbiol.* 18, 645–651. <https://doi.org/10.1111/cmi.12588>.
- Wong, Z.S., Hedges, L.M., Brownlie, J.C., and Johnson, K.N. (2011). *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025430>.
- Wong, Z.S., Brownlie, J.C., and Johnson, K.N. (2015). Oxidative stress correlates with *Wolbachia*-mediated antiviral protection in *Wolbachia*-*Drosophila* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3001–3005. <https://doi.org/10.1128/AEM.03847-14>.
- Wong, Z.S., Brownlie, J.C., and Johnson, K.N. (2016). Impact of ERK activation on fly survival and *Wolbachia*-mediated protection during virus infection. *J. Gen. Virol.* 97, 1446–1452.

<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000456>.

Woo, C.-H., Kim, T.-H., Choi, J.-A., Ryu, H.-C., Lee, J.E., You, H.-J., Bae, Y.-S., and Kim, J.-H. (2006). Inhibition of receptor internalization attenuates the TNF α -induced ROS generation in non-phagocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 972–978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.154>.

Woolfit, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J.C., Walker, T., Riegler, M., Seleznev, A., Popovici, J., Rancès, E., Wee, B.A., Pavlides, J., et al. (2013). Genomic evolution of the pathogenic *Wolbachia* strain, wMelPop. *Genome Biol. Evol.* *5*, 2189–2204. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt169>.

Wu, D., Daugherty, S.C., Van Aken, S.E., Pai, G.H., Watkins, K.L., Khouri, H., Tallon, L.J., Zaborsky, J.M., Dunbar, H.E., Tran, P.L., et al. (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* *4*, 1079–1092. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040188>.

Wu, M., Sun, L. V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., et al. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* *2*, 327–341. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020069>.

Xi, Z., Khoo, C.C.H., and Dobson, S.L. (2005). Ecology: *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes Aegypti* laboratory population. *Science* (80-.). *310*, 326–328. <https://doi.org/10.1126/science.1117607>.

Xi, Z., Gavotte, L., Xie, Y., and Dobson, S.L. (2008). Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. *BMC Genomics* *9*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-1>.

Yakovleva, I.M., Baird, A.H., Yamamoto, H.H., Bhagooli, R., Nonaka, M., and Hidaka, M. (2009). Algal symbionts increase oxidative damage and death in coral larvae at high temperatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *378*, 105–112. <https://doi.org/10.3354/meps07857>.

Yanoviak, S.P., Kaspari, M., Dudley, R., and Poinar, G. (2008). Parasite-induced fruit mimicry in a tropical canopy ant. *Am. Nat.* *171*, 536–544. <https://doi.org/10.1086/528968>.

Ye, Y.H., Woolfit, M., Rancès, E., O'Neill, S.L., and McGraw, E.A. (2013). *Wolbachia*-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002362>.

Yeap, H.L., Mee, P., Walker, T., Weeks, A.R., O'Neill, S.L., Johnson, P., Ritchie, S.A., Richardson, K.M., Doig, C., and Endersby, N.M. (2011). Dynamics of the “popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics* *187*, 583–595. .

You, H., Lee, W.J., and Lee, W.-J. (2014). Homeostasis between gut-associated microorganisms and the immune system in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* *30*, 48–53. .

Zaneveld, J.R., McMinds, R., and Thurber, R.V. (2017). Stress and stability: Applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nat. Microbiol.* *2*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.121>.

Zélé, F., Nicot, A., Duron, O., and Rivero, A. (2012). Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against Plasmodium-induced mortality in a natural system. *J. Evol. Biol.* *25*, 1243–1252. .

Zélé, F., Denoyelle, J., Duron, O., and Rivero, A. (2018). Can *Wolbachia* modulate the fecundity costs of Plasmodium in mosquitoes? *Parasitology* *145*, 775–782. .

- Zhang, G., Hussain, M., O'Neill, S.L., and Asgari, S. (2013). *Wolbachia* uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 10276–10281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303603110>.
- Zheng, Y., Wang, J.L., Liu, C., Wang, C.P., Walker, T., and Wang, Y.F. (2011). Differentially expressed profiles in the larval testes of *Wolbachia* infected and uninfected *Drosophila*. BMC Genomics 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-595>.
- Zhou, W., Rousset, F., and O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 265, 509–515. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>.
- Zouache, K., Michelland, R.J., FAILLOUX, A., Grundmann, G.L., and Mavingui, P. (2012). Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. Mol. Ecol. 21, 2297–2309. .
- Zug, R., and Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PLoS One 7, 7–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>.
- Zug, R., and Hammerstein, P. (2015). *Wolbachia* and the insect immune system: What reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-host interactions. Front. Microbiol. 6, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01201>.

VI. Annexes

VI.1 Recommendation *Peer Community Journal* :



Drift rather than host or parasite control can explain within-host *Wolbachia* growth

Alison Duncan and **Michael Hochberg** based on reviews by *Simon Fellous* and *1 anonymous reviewer*

A recommendation of:

Wolbachia load variation in *Drosophila* is more likely caused by drift than by host genetic factors

Alexis Bénard, Hélène Henri, Camille Noûs, Fabrice Vavre, Natacha Kremer (2021), *bioRxiv*, 2020.11.29.402545, ver. 4 recommended and peer-reviewed by Peer Community in Evolutionary Biology [10.1101/2020.11.29.402545](https://doi.org/10.1101/2020.11.29.402545)

Open Access

Submitted: 01 December 2020, Recommended: 04 May 2021

Published: 11 May 2021

Copyright: This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/>

Cite this recommendation as:

Alison Duncan and Michael Hochberg (2021) Drift rather than host or parasite control can explain within-host *Wolbachia* growth. *Peer Community in Evolutionary Biology*, 100126. [10.24072/pci.evolbiol.100126](https://doi.org/10.24072/pci.evolbiol.100126)

Recommendation

Within-host parasite density is tightly linked to parasite fitness often determining both transmission success and virulence (parasite-induced harm to the host) (Alizon et al., 2009, Anderson & May, 1982). Parasite density may thus be controlled by selection balancing these conflicting pressures. Actual within-host density regulation may be under host or parasite control, or due to other environmental factors (Wale et al., 2019, Vale et al., 2011, Chrostek et al., 2013). Vertically transmitted parasites may also be more vulnerable to drift associated with bottlenecks between generations, which may also determine within-host population size (Mathe-Hubert et al., 2019, Mira & Moran, 2002).

Bénard et al. (2021) use 3 experiments to disentangle the role of drift versus host factors in the control of within-host *Wolbachia* growth in *Drosophila melanogaster*. They use the wMelPop *Wolbachia* strain in which virulence (fly longevity) and within-host growth correlate positively with copy number in the genomic region Octomom (Chrostek et al., 2013, Chrostek & Teixeira, 2015). Octomom copy number can be used as a marker for different genetic lineages within the wMelPop strain.

In a first experiment, they introgressed and backcrossed this *Wolbachia* strain into 6 different host genetic backgrounds and show striking differences in within-host symbiont densities which correlate positively with Octomom copy number. This is consistent with host genotype selecting different *Wolbachia* strains, but also with bottlenecks and drift between generations. To distinguish between these possibilities, they perform 2 further experiments.

A second experiment repeated experiment 1, but this time introgression was into 3 independent lines of the Bolivia and USA *Drosophila* populations; those that, respectively, exhibited the lowest and highest *Wolbachia* density and Octomom copy

number. In this experiment, growth and Octomom copy number were measured across the 3 lines, for each population, after 1, 13 and 25 generations. Although there were little differences between replicates at generation 1, there were differences at generations 13 and 25 among the replicates of both the Bolivia and USA lines. These results are indicative of parasite control, or drift being responsible for within-host growth rather than host factors.

A third experiment tested whether Wolbachia density and copy number were under host or parasite control. This was done, again using the USA and Bolivia lines, but this time those from the first experiment, several generations following the initial introgression and backcrossing. The newly introgressed lines were again followed for 25 generations. At generation 1, Wolbachia phenotypes resembled those of the donor parasite population and not the recipient host population indicating a possible maternal effect, but a lack of host control over the parasite. Furthermore, Wolbachia densities and Octomom number differed among replicate lines through time for Bolivia populations and from the donor parasite lines for both populations. These differences among replicate lines that share both host and parasite origins suggest that drift and/or maternal effects are responsible for within-host Wolbachia density and Octomom number.

These findings indicate that drift appears to play a role in shaping Wolbachia evolution in this system. Nevertheless, completely ruling out the role of the host or parasite in controlling densities will require further study. The findings of Bénard and coworkers (2021) should stimulate future work on the contribution of drift to the evolution of vertically transmitted parasites.

References

- Alizon S, Hurford A, Mideo N, Baalen MV (2009) Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 245–259. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x>
- Anderson RM, May RM (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85, 411–426. <https://doi.org/10.1017/S0031182000055360>
- Bénard A, Henri H, Noûs C, Vavre F, Kremer N (2021) Wolbachia load variation in *Drosophila* is more likely caused by drift than by host genetic factors. *bioRxiv*, 2020.11.29.402545, ver. 4 recommended and peer-reviewed by Peer Community in Evolutionary Biology. <https://doi.org/10.1101/2020.11.29.402545>
- Chrostek E, Marialva MSP, Esteves SS, Weinert LA, Martinez J, Jiggins FM, Teixeira L (2013) Wolbachia Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLOS Genetics*, 9, e1003896. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003896>
- Chrostek E, Teixeira L (2015) Mutualism Breakdown by Amplification of Wolbachia Genes. *PLOS Biology*, 13, e1002065. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002065>
- Mathé-Hubert H, Kaech H, Hertaeg C, Jaenike J, Vorburger C (2019) Nonrandom associations of maternally transmitted symbionts in insects: The roles of drift versus biased cotransmission and selection. *Molecular Ecology*, 28, 5330–5346. <https://doi.org/10.1111/mec.15206>
- Mira A, Moran NA (2002) Estimating Population Size and Transmission Bottlenecks in Maternally Transmitted Endosymbiotic Bacteria. *Microbial Ecology*, 44, 137–143. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-0012-9>
- Vale PF, Wilson AJ, Best A, Boots M, Little TJ (2011) Epidemiological, Evolutionary, and Coevolutionary Implications of Context-Dependent Parasitism. *The American Naturalist*, 177, 510–521. <https://doi.org/10.1086/659002>
- Wale N, Jones MJ, Sim DG, Read AF, King AA (2019) The contribution of host cell-directed vs. parasite-directed immunity to the disease and dynamics of malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 22386–22392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908147116>

Reviews

Toggle reviews

Revision round #2

2021-04-16

Author's Reply

[Download tracked changes file](#)

Please find the new version of the manuscript.

We have made the suggested changes in the text and modified the title as the Reviewers suggested (highlighted in yellow in the attached tracked changes document).

We hope that this study will be suitable for recommendation by PCI.

Natacha Kremer

Decision round #2

Dear Authors,

The two reviewers were satisfied overall with your revisions and recommend that following these your preprint be approved by PCI. In parallel, Dr. Alison Duncan, who is co-recommending your preprint, has made numerous minor corrections to the manuscript that we hope you will consider in your revised submission. I will send the Word doc to you shortly.

Yours,

Michael

[Download recommender's annotations \(PDF\)](#)

Preprint DOI: [10.1101/2020.11.29.402545](https://doi.org/10.1101/2020.11.29.402545)

Reviewed by [Simon Fellous](#), 2021-03-22 16:25

The authors addressed my comments in a satisfactory fashion.

The only question that remains is whether this protocol enables disentangling drift from selection on *Wolbachia* density. Conspicuous selective factors, which would have varied among fly vials, could indeed explain the reported variations. I agree with the authors that abiotic factors, such as temperature, are unlikely candidates. However, I would imagine that among-vial variations of other biotic factors, such as bacterial gut symbionts, viruses other than DCV, or even transposable elements may have run unnoticed.

This comment should not prevent publication.

But, maybe would it be wise to change the title to something closer to the observations, for example, by highlighting the lack of effect of host genotype on *Wolbachia* density and octomom copy number.

Reviewed by anonymous reviewer, 2021-04-14 12:53

I think the authors addressed all the comments raised on the previous version. Just one more comment: I find the title rather confusing. I suggest changing it to something explicit like “No evidence for host genotype effects on Wolbachia density” or “Wolbachia load variation in *Drosophila* is more likely caused by drift than host genetic factors”

Revision round #1

2021-01-21

Author's Reply

[Download author's reply \(PDF file\)](#)[Download tracked changes file](#)

Decision round #1

Dear Dr. Kremer,

Your preprint has now been seen by two Reviewers. Their comments accompany this letter. Although both see interest in what your study attempts to achieve, they both have major reservations about the interpretation of the results. Both Reviewers question whether the study convincingly shows drift (and the absence of host genotype effects). Their arguments about possible alternative explanations for your results suggest that you will need to rethink your interpretations and revise accordingly, with the possible additional presentations/analyses suggested notably by Reviewer 2.

I would therefore encourage you to revise and resubmit your preprint to PCI Evolutionary Biology together with point-by-point replies to each of the reviewers' comments. Please indicate in each reply where changes were made in the manuscript. Once your revision is received, we will contact both reviewers for their views on whether their concerns have been adequately addressed.

Yours sincerely, Michael Hochberg

Preprint DOI: [10.1101/2020.11.29.402545](https://doi.org/10.1101/2020.11.29.402545)

Reviewed by anonymous reviewer, 2020-12-24 13:47

In this study, the authors introgressed a Wolbachia strain into six different (previously uninfected) *Drosophila* lines to evaluate if host genotype has an influence on Wolbachia loads and Octomom copy numbers within Wolbachia genomes (octomom copy numbers were previously shown to be positively correlated with Wolbachia loads). Although Wolbachia loads significantly varied among introgression lines, the authors could not conclude that host genotype affected Wolbachia loads because only a single introgression line per host genotype was generated. The authors therefore generated three replicate introgression lines for two host genotypes in a second experiment, as well as reciprocal crosses between the two host genotypes. Because they found extensive load variation among replicate lines within genotypes, as well as variation over time within lines, they conclude that host genotype has no effect on Wolbachia load. Instead, they suggest that load variation is a consequence of drift.

Although I am generally strongly in favor of publishing “negative results”, I am not convinced that the study shows absence of host genotype effects on Wolbachia loads. The data also do not show that load variation is caused largely by drift (although I agree with the authors that the initial endosymbiont load in eggs may indeed be quite important, the data do not show this). I do agree with the authors that the variation among generations and replicate lines within the two genotypes is striking. But the authors only analyze two host

genotypes with multiple replicates for introgression crosses, and based on a sample of $n=2$ I would not conclude absence of host genetic background effects. Furthermore, we do not actually know the nuclear genome composition of the introgression lines (Fig. 1 is an expectation for neutral polymorphisms...). For example, there could be selection for the retention of w1118-derived haplotypes during introgression of Wolbachia, or presence/absence of w1118-derived haplotypes in females could actually influence Wolbachia loads. Thus, different replicate lines within genotypes could fix w1118 alleles in different regions following the arrest of introgression. I don't know how likely this is, but hope these examples illustrate the different reasons why I am not convinced this study shows that host genotype is not an important driver of endosymbiont load.

It would also be helpful if the authors could clarify sample sizes. For example, how large were the population sizes during introgression and during the maintenance of the introgression lines? What was the protocol for the maintenance (eg. would it be possible than only a small portion of females contributed offspring to the next generation?). This information would be useful to assess the potential for drift. Also, why waiting 8 generations after the introgression protocol to measure Wolbachia load? How many individuals per strain were used to quantify Wolbachia loads and octomom copies? etc.

Minor comments.

I am not sure what to make from the positive correlation between load and octomom copy number. What does it mean exactly? Do the authors find anything new here with respect to previous studies? Or is it an independent confirmation of the same pattern (also useful) – would be helpful if this could be clarified.

I suggest revising the statement L240 “...These results suggest that different host genetic backgrounds selected specific variants of the symbiotic community. However, other factors, like genetic drift through a founder effect during the vertical transmission of symbionts from the donor line and / or from one host generation to the other, could also explain this pattern.” The results are “consistent with”, but since the authors later revise their conclusion, better not first suggest the results are caused by host genetic effects.

L11 density of endosymbiont density

L17 I would say “between host individuals”

Some explanation for the positive correlation of octomom copies and bacterial density as a consequence of drift would be useful in the abstract

L82 flies “with endosymbionts” harboring more copies of Octomom (note that throughout the text, it is often not clear, from the formulation, whether the flies or Wolbachia have octomom copies).

L89 symbionts (plural)

Figure 1, second panel doesn't really depict a reciprocal cross (but a unidirectional introgression cross as in the first panel).

L130 explained (past)

L140 and following (Quantification of wMelPop density and Octomom copy number): I suppose this was done on female flies only? (please clarify)

L211-212 reformulate to “differ significantly among introgression lines” – the statement “are significantly influenced by the host genotype” goes against the author's own interpretations and would in fact require replicate introgression experiments per genotype.

L230 remove double citation of the same paper

Reviewed by Simon Fellous, 2021-01-20 14:49

In this manuscript Bénard et al. describe the results of a series of experiments exploring the genetic determinants of intra-cellular symbiont regulation in insect hosts. Using the *Drosophila melanogaster*-Wolbachia system, the authors tested whether host genotype controls symbiont cell density. This work builds upon previous studies from these and other authors that established a link between the number of copies of the Octomom gene in Wolbachia and symbiont density. The present study did not observe stable host control of symbiont numbers over time, suggesting drift largely determines how many symbionts may be found in

hosts. The experiments and analysis appear sound and the writing is clear. It is a well thought study. I only have comments on the discussion/interpretation of the data and would welcome a couple of additional analyses and figures. Once these points are addressed, the manuscript should make an excellent contribution to PCI Evol Bio and the field in general. Major comments: . The conclusion that drift during maternal transmission is the main factor at play is based on the lack of effect of host genetics on Wolbachia density. However, you did not discuss the possibility that unidentified selective pressures drove these variations. External selective factors could indeed vary over time and among fly lines/fly vials. For example, Rohrscheib et al. (2016) argue an abiotic factor such as temperature can drive Wolbachia density variations. Similarly, these bacteria being involved in anti-viral defences, outbreaks of viruses in fly vials could have run unnoticed. Incidentally, it would explain why symbiont densities reached peaks and dropped simultaneously in some line replicates. Do you have reasons to exclude selection by external factors as a determinant of Wolbachia density? . Along these lines, do you exclude the possibility that a gene or set of Wolbachia genes different from Octomom determined symbiont density? In that case maybe did these factors evolved quickly. . The initial relationship between Octomom copy number and Wolbachia density is useful to formulate your hypotheses (Fig 3). It would be equally useful to present this correlation, or lack of, in the final sets of data (from Fig 4 and 5). Btw, do you have individual data? This would give an idea of within-host line variation? Does the correlation stand at the scale of individuals as well as populations? . L 401-404: association between mean symbiont numbers and variance is reported but not statistically tested nor illustrated. Can you please provide support to this element of discussion? Also, does the relationship stand when data is log-transformed? ... simply because greater variance is to be expected when mean increases. . L 410-414: is it possible to distinguish transmission drift from host population drift? One is necessarily nested into the other. A naïve expectation (my naïve expectation to be fair) would be that even if transmission drift was high, a lack of pop drift should maintain mean symbiont density due to a population scale averaging effect. In other words, transmission drift may only drive trait variation if associated with subsequent host population bottlenecks, that is with population drift. Minor suggestions : L 19 : “between partners” please be more specific ^[1]_[SEP] L 42-43: this description better matches horizontally transmitted parasites that vertically transmitted ones. Maybe talk about reproductive output? Baby numbers... L 44: rather than density, maybe use reproduction rate or resource exploitation rate. These terms are compatible with macroparasites which numbers don't change even though they extract more or less resources from their host. L96: please give equivalent location precision for all pops Simon Fellous

VI.2 Revue *Frontiers in Ecology and Evolution*



Stress & Symbiosis: Heads or Tails?

Alexis Bénard, Fabrice Vavre and Natacha Kremer*

Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR 5558, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Villeurbanne, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Anne Duplouy,
Lund University, Sweden

Reviewed by:

Martin Kaltenpoth,
Johannes Gutenberg University
Mainz, Germany
Matsapurte Detcharoen,
University of Innsbruck, Austria

*Correspondence:

Natacha Kremer
natacha.kremer@normalesup.org

Specialty section:

This article was submitted to
Coevolution,
a section of the journal
Frontiers in Ecology and Evolution

Received: 13 February 2020

Accepted: 13 May 2020

Published: 09 June 2020

Citation:

Bénard A, Vavre F and Kremer N
(2020) Stress & Symbiosis: Heads or
Tails? *Front. Ecol. Evol.* 8:167.
doi: 10.3389/fevo.2020.00167

An increasing number of organisms are subjected to abiotic (e.g., air, water, and soil quality, temperature), but also biotic (e.g., new pathogens) stressors. These stressors may disturb the chemical and physiological homeostasis of living systems, and thus impact their ecology and evolution. Because eukaryotes are often associated with symbionts, these changes do not only impact the host but rather the holobiont, an assemblage of interacting species. Indeed, stressors can modify the symbiotic community composition and functions directly, but also indirectly through their impact on host physiology. Any disruption of the symbiotic homeostasis can then impact the host fitness. On the other side, several symbionts protect their host against various threats, and they may facilitate the adaptation of the holobiont to the new environment by limiting the negative impact of stress on the host. It now remains to clarify if their presence constitutes a driver of adaptation of the host or an obstacle limiting the selection of adaptive traits in the host, and to discuss if symbiosis is always the optimal strategy to cope with stressors. The reciprocal impact between stress and symbiosis can become more complex when stressors are considered in combination, as it occurs in nature. Indeed, synergistic or antagonistic effects may impact the holobiont response, and studies characterizing individual disturbances may not be sufficient. In the current context of climate change and globalized pollution, it is thus crucial to develop integrative approaches to predict how organisms, communities and ecosystems will face combinations of stressors.

Keywords: biotic and abiotic stressors, symbiotic communities, stress-response mechanisms, beneficial symbiosis, adaptation

INTRODUCTION

Stress is an ambiguous term that causes confusion when attempting to understand organismal responses to environmental change, because it is often used to refer to both the environmental perturbation and the response itself (Schulte, 2014). To gain clarity, we will consider here the *stressor* as any biotic or abiotic environmental factor able to disrupt homeostasis, the *stress* as an actual or potential decline in the fitness of the organism after exposure to a stressor, and the *stress response* as the physiological and behavioral response to the stressor (see review on existing definitions of stress in Schulte, 2014). Depending on the nature of the stressor, its intensity and its occurrence (i.e., single, episodic, or chronic), the organism may adapt -or not- to the environmental stressor through the selection of plastic or genetic stress response mechanisms that

buffer the stressor (Rymer et al., 2016). This ability to persist after such stress is called resilience (Hodgson et al., 2015), but in some cases, the organisms cannot cope with the stressors, which strongly decrease their fitness.

A majority of organisms live in tight relationship with other organisms, and this assemblage is called holobiont. In this case, stressors may affect not only the host but also its symbiotic community (i.e., parasites, commensals, or mutualists), and the relationship between partners. A canonical example is the negative impact of global warming on the coral holobiont, which leads to symbiosis breakdown (Paxton et al., 2013), and reef ecosystem destabilization (Putnam et al., 2017). On the other side, some symbionts are described to protect their host against different kinds of stressors and can play a role in the adaptation of the holobiont to stressful environments (Miransari, 2010; Feldhaar, 2011; Flórez et al., 2015; Shapira, 2016; Hopkins et al., 2017).

Because global changes associated with anthropization impose stressors to many ecosystems, we need to better understand the role of symbiosis in the vulnerability or resilience to stressors. In this review, we will thus focus on acute stressors and directed changes in the environment, such as global change, and their interaction with symbionts across animals and plants. We will first develop some examples on the impact of such biotic and abiotic stressors on holobionts, and on the influence of symbionts on organism resilience (Figure 1). We will then discuss different factors that can influence the selection of specific stress response mechanisms, including genetic and phenotypic responses from the host and the symbionts, and debate if the association of organisms with symbionts is the optimal strategy to cope with stressors.

THE VULNERABILITY OF SYMBIOTIC ASSOCIATIONS TO STRESSORS

Symbiotic communities are very dynamic and often change over the host lifespan, in response to changes in host physiological states (life stages, immunity, etc.), but also to environmental perturbations. Many stressors strongly impact relative abundances and shift symbiotic communities of well-established symbioses, thus impacting host physiology, and at a larger scale, ecological communities.

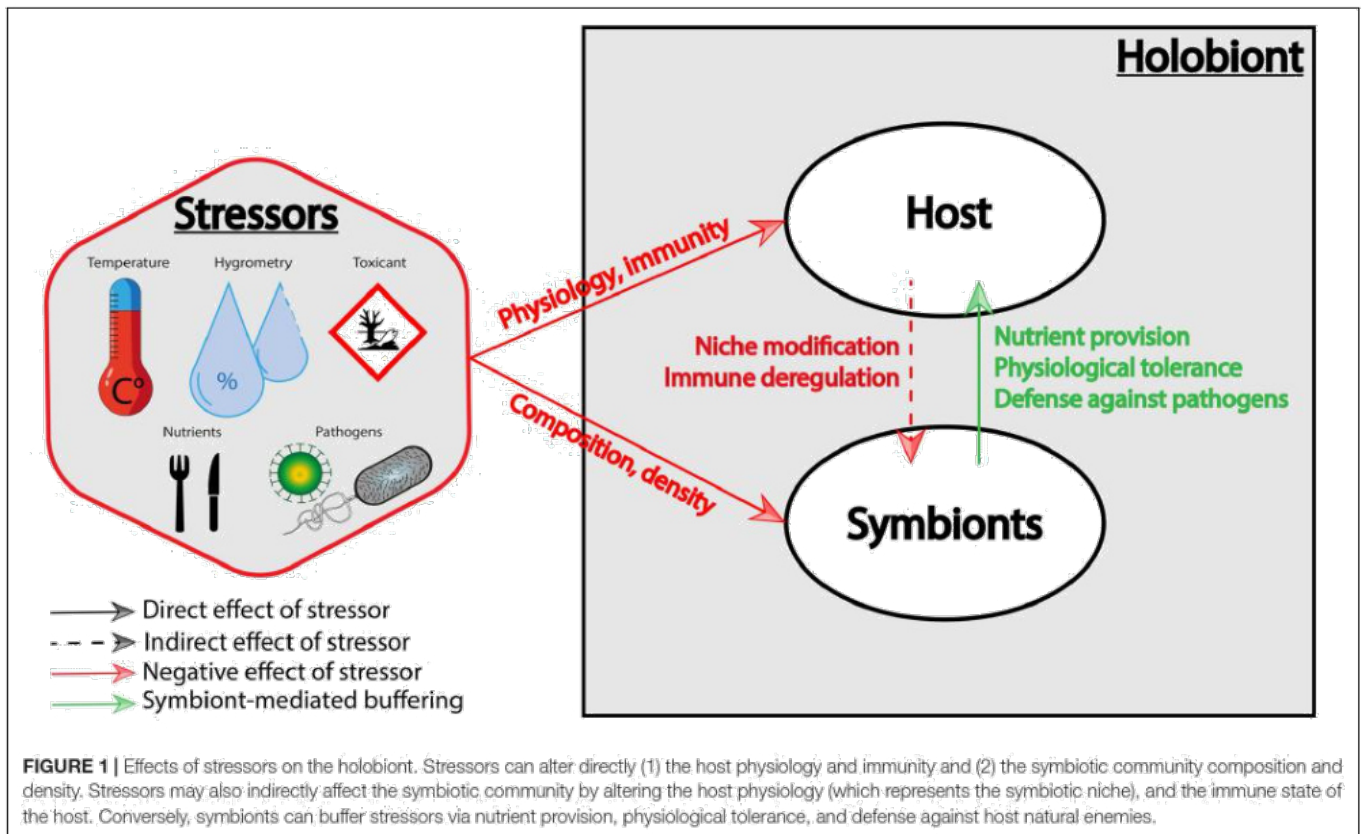
Certain acute stressors can specifically modify the composition of symbiotic communities, as observed in many host species, such as sponges (Blanquer et al., 2016), scleractinian corals (Thurber et al., 2009), mice (Ravussin et al., 2012; Bharwani et al., 2016), plants (Erlacher et al., 2015; Santos-Medellín et al., 2017), or insects (Muturi et al., 2016). When host are colonized by a single symbiont, stressors can also directly impact symbiont density. For instance, a cold shock decreases *Cardinium* density in parasitoid wasps (Doremus et al., 2019). Elevated temperatures can also eliminate symbionts, like the gut bacteria necessary for the survival of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Kikuchi et al., 2016).

The impact of stressors on symbiotic communities can also be indirect, through the modification of the host niche where symbionts reside [e.g., in plants: nutrients, exudates, and signaling molecules (Hartman and Tringe, 2019)]. This is also particularly true for intracellular symbionts, whose density can decrease in response to the effect of stressors on host cell physiology (Moné et al., 2014). For instance, sublethal doses of insecticides (e.g., the neurotoxic molecule thiamethoxan), or pesticides (e.g., the pro-oxidant paraquat), respectively, decrease the density of *Buchnera* obligate symbiont in soybean aphids (Enders and Miller, 2016), and *Wolbachia* facultative endosymbionts in fruit flies (Monnin et al., 2016).

Stressors can also indirectly impact host-associated symbiotic communities through an effect on host immunity. Indeed, the disruption of host immunity can modify the control of symbionts, and/or allow opportunistic symbionts to invade the host (Williams et al., 2016). For instance, *Ostreid herpesvirus* infections cause an immune-compromised state in pacific oysters that leads to a massive opportunistic pathogen proliferation (de Lorgeril et al., 2018), and neonicotinoid pesticides affect honey bee immunity and promote viral pathogen replication (O'Neal et al., 2018). In plants, as the high temperature compromises the salicylic acid pathway that mediates the response against pathogens, climate change may also enhance susceptibility to pathogens (Huot et al., 2017).

Such changes in community are generally characterized at the symbiotic taxonomic level by a rapid decrease in the intra-individual diversity, but stressors can also impact stochastically the microbiome composition and increase the inter-individual diversity (Kandalepas et al., 2015; Rocca et al., 2019). As proposed by the “Anna Karenina principle” applied to the symbiotic community, “all healthy microbiomes are similar but each dysbiotic microbiome is dysbiotic in its own way” (Lesser et al., 2016; Zaneveld et al., 2017). These increases in β -diversity are notably observed after recovery or directed change in the environment (Silverstein et al., 2015; Ahmed et al., 2019), and could result from a host immune dysregulation or the release of the symbiotic niche by a sensitive symbiont.

Overall, because the symbiotic composition is tightly regulated, any disruption of the symbiotic homeostasis can change the costs and benefits associated with the presence of symbionts. This unbalance can result in a transition along the mutualism-parasitism continuum and impact the associated ecosystem (Kiers et al., 2010). One of the most striking illustrations of the immediate effects of environmental perturbations is the coral bleaching resulting from the impact of heat stress on cnidarian-dinoflagellate symbioses. Indeed, elevated temperatures photo-inhibit dinoflagellate algae and alter the metabolism of both partners. In sub-bleaching conditions, the mutualistic *Symbiodinium* algae then becomes a nutritional parasite, as it overtakes resources from its coral host (Baker et al., 2018). Temperature increase thus induces changes in metabolic profiles and cellular responses associated to bleaching (Hillyer et al., 2016), and the destabilization of the coral ecosystem (Pita et al., 2018).



SYMBIOSIS AS AN ADAPTIVE RESPONSE TO STRESSORS

We have shown above that stressors can negatively impact symbiotic partners, but symbionts can also participate in the buffering of stressors, in providing to their host a resistance or a tolerance mechanism, which that reduces the fitness costs associated to stressors (Miransari, 2010; Clay, 2014; Shapira, 2016; Lemoine et al., 2020). These two mechanisms are involved in the resilience to stressors, through the withstanding of a stressor that is normally unfavorable. Classically defined in immunology, resistance limits the parasite burden while tolerance limits the physiological impact of the parasite burden without decreasing its amount (Råberg et al., 2009), but these definitions can be broadened to any kind of stressor. The following is a non-exhaustive series of examples that suggest the driver effect of symbiosis in host adaptation to stressors.

A first series concerns symbionts that limit perturbations associated with seasonal abiotic variations, such as drought, salinity, or heat stress. For instance, endophytic fungi can promote plant growth and survival under such abiotic stress (Azad and Kaminskyj, 2016), potentially *via* the elicitation of induced systemic tolerance (Qin et al., 2016). Arbuscular mycorrhiza can promote plant tolerance to salinity and water stress by an adjustment of osmolytes (e.g., carbohydrates and electrolytes) in plant roots (Miransari, 2010). The endosymbiont *Buchnera* confers thermal tolerance to aphids through the expression of a small heat-shock protein (Dunbar et al., 2007),

and tyrosine-supplementing symbionts protect beetles from desiccation through the production of a thicker cuticle (Vigneron et al., 2014; Anbutsu et al., 2017; Engl et al., 2018). Also, the proportion of heat-tolerant algal or bacterial symbionts increases in reefs that are severely affected by climate change (Baker et al., 2004), which promotes carbohydrate metabolism, nitrogen fixation, iron scavenging, and protein folding (Ziegler et al., 2017). Seasonal abiotic variations can also limit resources, and certain symbionts can benefit hosts experiencing a sporadic nutritional stress. For instance, arbuscular mycorrhiza improve Phosphorus and Nitrogen fixation in plants from impoverished soils (Johnson et al., 2010), and fly gut microbiota (*Lactobacillus plantarum* in particular) promotes larval growth upon food deprivation by modulating hormonal signals (Storelli et al., 2011).

In addition to abiotic stressors, various symbionts can protect their host against biotic stressors: their natural enemies. Because of the abundant literature in this field, we will focus on insect symbioses, and highlight a few canonical examples [but see extensive reviews such as Flórez et al. (2015) in animals and Pieterse et al. (2014) in plants]. Symbionts can protect their host in different ways. The most documented way is when defensive symbionts produce specific toxins targeting the competitor. For instance, the APSE bacteriophage from *Hamiltonella defensa* protects aphids against parasitoid wasp attacks (Oliver et al., 2009; Martínez et al., 2014). The maternally inherited bacterium *Spiroplasma* limits the sterilization of *Drosophila neotestacea* flies by parasitic nematodes, through the production of a toxin

(Jaenike et al., 2010; Hamilton et al., 2016). *Streptomyces* bacteria are released from the antennal reservoirs of bees, coat the brood cell, and secrete antimicrobial peptides that protect the immature wasp against opportunistic fungi from the soil (Kaltenpoth et al., 2005; Koehler et al., 2013). Symbionts can also turn the insect food into compounds that are toxic against many pathogens. This is the case of phenolic compounds converted by locust gut symbionts from plant secondary metabolites (Dillon and Charnley, 2002), or organic acids produced by honeybee gut symbionts from lactic acid fermentation (Olofsson et al., 2016). Such organic products decrease pH, and can modify the host niche in a way that limits pathogen survival (Palmer-Young et al., 2019). Additionally, symbionts can prime host immunity, as it has been reported with *Wolbachia* in the mosquito *Aedes aegypti* (Moreira et al., 2009). Finally, they can exploit the same limited resource as the parasite (Gerardo and Parker, 2014), and enter in competition with it. For instance *Wolbachia*, which blocks viral replication of positive-strand RNA viruses in *Drosophila* and mosquitoes (Teixeira et al., 2008; Bian et al., 2010), possibly exploits cholesterol necessary for viral replication (Caragata et al., 2013).

To summarize, symbionts constitute a “pool of genes” potentially involved in several physiological functions and can be acquired rapidly by the host. Such symbionts could thus be part of an adaptive response to environmental changes, and eventually get to fixation if biotic and abiotic constraints are stable and impose a strong selective pressure, and if the benefit of carrying symbionts is higher than its cost.

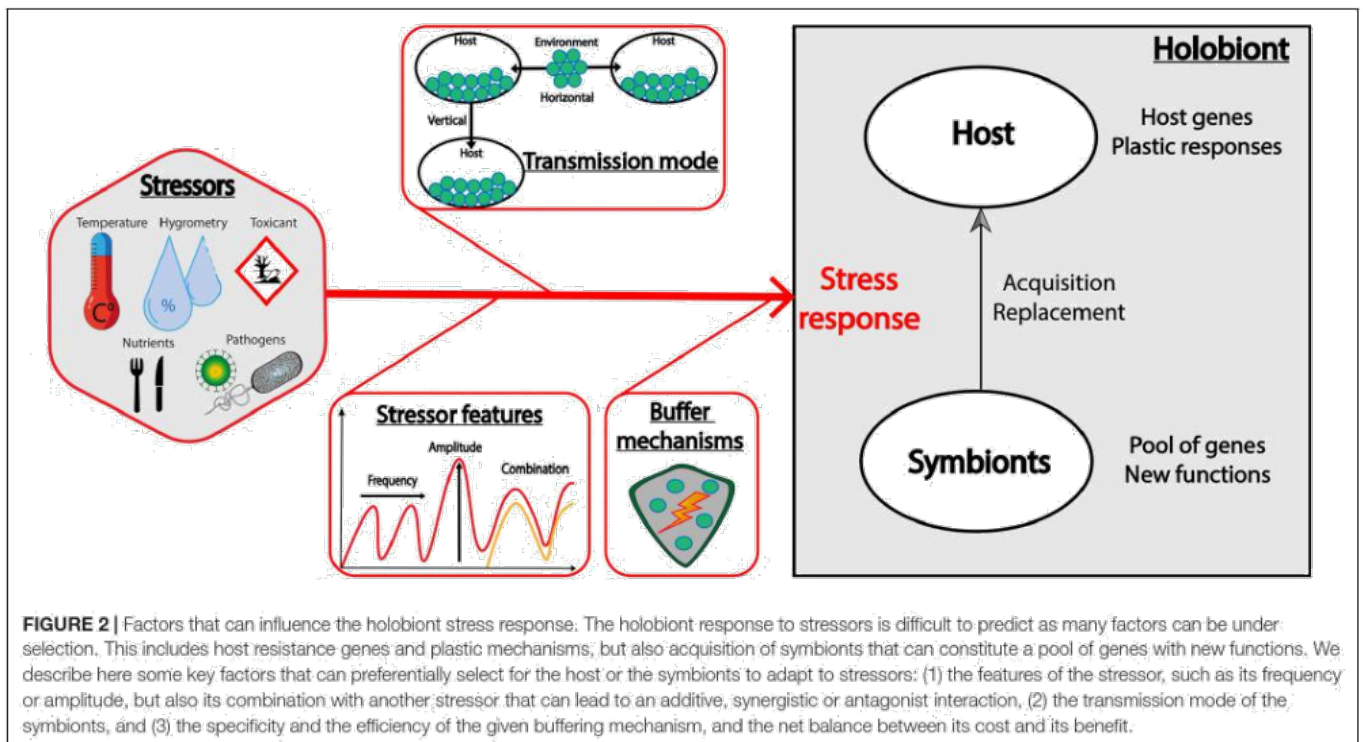
SYMBIOSIS AND ADAPTATION: ALWAYS AN OPTIMAL STRATEGY?

As presented above, the presence of symbionts can limit the fitness costs associated with a stressful condition (Latef et al., 2016; Shapira, 2016; Corbin et al., 2017; Hopkins et al., 2017) through an impact on various physiological functions (Oliver et al., 2003; Webster and Reusch, 2017; Cheng et al., 2019). However, various host mechanisms can also be involved in the buffering of stressors (examples for immune responses: Palmer and Traylor-Knowles, 2012; Lamiable and Imler, 2014; Obbard and Dudas, 2014; Kenney et al., 2017; Miller et al., 2017). The question that arises is thus whether the association with symbionts is always the optimal strategy, that is, the more efficient one to buffer the stress at a reduced cost. In other words, does symbiosis drive or limit host adaptation to a new, stressful environment?

First imagine that the stressor is frequent, such as a directed change in the environment. In that case, the selection for genetic, heritable mechanisms that counteract stressors should be strong. It can include specific host genes, such as resistance genes against particular stressors. For instance, high affinity transporter genes are selected in plants under scarce Nitrogen availability (Kiba and Krapp, 2016). It can also include the selection of specific symbionts such as *Regiella insecticola* in pea aphids, whose frequency follows a gradient throughout Japan and is associated with changes in temperature, precipitation and host

plant (Tsuchida et al., 2002). Both mechanisms can also be selected for: adaptation of *Platygyra* corals to high temperatures mirrors the fixation of host alleles limiting oxidative stress together with the selection of zooxanthellae variants that are photosynthetically thermotolerant (Howells et al., 2016). On a broader evolutionary time scale and in the case of stable changes, symbiont acquisition can play an important role in ecological adaptation and innovation (Wernegreen and Wheeler, 2009; Douglas, 2015; Sudakaran et al., 2017). An extreme case is the evolution of co-dependency between insects feeding on unbalanced diets (e.g., phloem, blood) and their nutritional vertically-transmitted symbionts (Moran et al., 2003; Douglas, 2009): *Buchnera* or *Serratia* in aphids (Shigenobu and Wilson, 2011; Monnin et al., 2020); *Wigglesworthia*, *Wolbachia* and *Rickettsia* in tsetse flies, bed bugs, and ticks, respectively (Rio et al., 2016; Duron et al., 2018).

Let's now imagine a case where the stressor(s) fluctuate(s), in term of intensity or temporality. We would expect that plastic mechanisms should be favored in that situation. Indeed, host resistance mechanisms may be costly when constitutively expressed, unless compensation mechanisms are selected for, in the absence of stressor (Kliot and Ghanim, 2012; but see Ffrench-Constant and Bass, 2017). Presence of symbionts may also be costly in the absence of stressor, notably when the response against stressor is mediated by a high symbiotic density that consumes nutrients and uses the cellular machinery (Martinez et al., 2015; Hopkins et al., 2017). This is particularly true for vertically-transmitted symbionts, whose modulation by the host in the absence of stressor is limited. For instance, the presence of *Hamiltonella defensa*, an endosymbiont that efficiently protects aphids against parasitoid attacks but is highly costly in its absence (Polin et al., 2014), might not be an optimal defense strategy (Hopkins et al., 2017). In addition, the presence of symbionts can negatively impact the selection of host genes that buffer stressors. Indeed, Metcalf and Koskella (2019) predict from a theoretical point of view that defensive symbionts (or more generally microbiomes that favor resistance or tolerance against a pathogen) can decrease the selection for host immune mechanisms and drive the loss of immunity, especially when the cost of host immunity is high. The potential of symbionts to be a possible obstacle to the selection of host adaptive responses has been tested in fruit flies, where *Wolbachia* can protect the host against RNA viruses (Teixeira et al., 2008). After evolution in a context of viral infection, the presence of *Wolbachia* in flies reduced the strength of selection for the host resistance gene *Pastrel* (Martinez et al., 2016); strength that was increased again after the removal of *Wolbachia* (Faria et al., 2018). Alternatively, plastic mechanisms, such as programming of host gene expression, chromatin remodeling (e.g., histone modifications, chromatin compartmentalization) have been observed during many fluctuating biotic and abiotic stress responses in insects, mammals (Vihervaara et al., 2018), plants (Lämke and Bäurle, 2017), and marine organisms (Eirin-Lopez and Putnam, 2019). Also, a rapid change in the composition of the host-associated symbiotic community, notably when symbionts are horizontally acquired from the environment, can constitute a tremendous resource of biological



functions that can be involved in the control of stressors. For instance, the composition and functional profile of the microbiome of the coral *Acropora hyacinthus* quickly shifts in response to a transient heat stress (Ziegler et al., 2017). These composition changes can result from the selection of fittest symbionts in this new stressful environment (Suggett et al., 2017), but can also result from host partner choice within a “biological market” of horizontally-transmitted symbionts (Werner et al., 2014). This partner choice has been exemplified in symbioses between plants and arbuscular mycorrhizal fungi, where fungi provide nutrients such as Nitrogen and Phosphorus to plants in exchange of carbohydrates. Depending on the resource abundance and fluctuations, plants can select for specific strains of fungi that offer the most soil-limited nutrients (Werner and Kiers, 2015).

To summarize (Figure 2), the two extreme situations above suggest that the frequency of stressors can select for different degrees of plasticity for the buffering mechanism. Both host and symbionts can carry this stress response mechanism, but in case of symbiosis, the transmission mode plays a central role in the versatility of the response. Indeed, horizontally-transmitted symbionts should be favored in a fluctuant environment, as they constitute a flexible microbial pool in the environment from which certain variants can be selected for, while vertically-transmitted symbionts should be favored in a constant environment, as they are durably associated with their host. Whether the stressor is frequent or fluctuant, the acquisition of a symbiont by a host (when possible) is an efficient way to acquire simultaneously a pool of genes potentially encoding for functions that the host does not necessarily possess. However, when host and symbionts express genes with

redundant functions, the presence of symbionts might not always be the optimal strategy, as it can be more costly than the expression of specific host genes, and/or can limit the evolution of the host.

PERSPECTIVES: HOW CAN WE INTEGRATE SYMBIOSIS IN OUR UNDERSTANDING OF BIOLOGICAL RESPONSE TO GLOBAL CHANGES?

Because stressors can impact symbiotic associations and, reciprocally, symbiosis can impact the response of organisms to stressors, it is important to consider symbiosis when we study the response of organisms in a context of global change. But global change means that stressors occur in combination rather than alone (Crain et al., 2008; Munns, 2011; Goulson et al., 2015; Van Dam et al., 2015), and this strongly complicates the framework developed above: the combination of stressors can vary depending on the timing of each stressor, the frequency and intensity of the exposure, and the spatial distribution of all individual stressors; the effect of several stressors can be additive, synergistic or antagonistic (i.e., interactions leading to a equal, greater or a lower effect than the sum of the stresses, respectively); and symbiotic composition and function can vary differentially in response to each stressor. In insects for instance, the reciprocal link between symbiosis and stressors is critical to consider, as the genome reduction of obligate nutritional symbionts makes them particularly sensitive to heat. In the case of a temperature increase, the reduction of symbiont density could decrease the buffering effect against another stress (e.g., infection, nutritional

stress). In case of obligate mutualism, the loss of symbionts could indirectly lead to the extinction of the insect species, except if symbiont switching/complementation occurs (Wernegreen, 2013; Kikuchi et al., 2016; Corbin et al., 2017; Renoz et al., 2019).

Considering as many stressors as possible, together with their dynamics (e.g., constant/fluctuant, simultaneous/sequential), is crucial to fit to ecologically relevant situations (Gunderson et al., 2016), but very difficult to investigate. Still, quantifying the relative effect of each stressor remains determinant to pinpoint the main disruptive factors, and to focus studies on these few stressors. A characterization of their effects on tissues, individuals and ecosystems can then help to define actions that will limit their impacts (Anthony et al., 2015; Foucart, 2019). To reach this goal, a few mathematical models have been developed to integrate multiple stressors (Liess et al., 2016), to explore tipping points under combined stressors including parasitic pressure (bee decline: Henry et al., 2017), or to predict the evolution of species dynamics (coral bleaching: Cuning et al., 2017). However, their development requires an extensive knowledge on molecular, physiological, and ecological mechanisms associated with symbiosis to define appropriate formulation and parameterization (Widder et al., 2016). For instance, knowing the mechanism of action of two stressors on both partners can help in determining if they are conserved or pleiotropic (Sewelam et al., 2016; Jacob et al., 2017), and thus to predict a potential synergy or antagonism (Kaunisto et al., 2016). There is thus an urgent need to develop integrative studies to better understand the molecular mechanisms involved in response to stressors, the link between structure and function of symbiotic communities, the dialogue between host and symbionts, and the influence of symbiotic functions on more global ecological processes. This integrative approach can combine methodologies characterizing multiple organization levels such as genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ecological network analyses (e.g., Bissett et al., 2013; Colgan et al., 2017; Larrainzar and Wienkoop, 2017; Meena et al., 2017; Rodriguez et al., 2019; Weis, 2019).

REFERENCES

- Ahmed, H. I., Herrera, M., Liew, Y. J., and Aranda, M. (2019). Long-term temperature stress in the coral model *Aiptasia* supports the “anna Karenina principle” for bacterial microbiomes. *Front. Microbiol.* 10:975. doi: 10.3389/fmicb.2019.00975
- Anbutsu, H., Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., Futahashi, R., Tanahashi, M., et al. (2017). Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E8382–E8391. doi: 10.1073/pnas.1712857114
- Anthony, K. R. N., Marshall, P. A., Abdulla, A., Beeden, R., Bergh, C., Black, R., et al. (2015). Operationalizing resilience for adaptive coral reef management under global environmental change. *Glob. Chang. Biol.* 21, 48–61. doi: 10.1111/gcb.12700
- Azad, K., and Kaminskyj, S. (2016). A fungal endophyte strategy for mitigating the effect of salt and drought stress on plant growth. *Symbiosis* 68, 73–78. doi: 10.1007/s13199-015-0370-y
- Baker, A. C., Starger, C. J., McClanahan, T. R., and Glynn, P. W. (2004). Corals' adaptive response to climate change. *Nature* 430, 741–741. doi: 10.1038/430741a

Finally, as the acquisition of new symbionts or the modification of symbiotic communities can play a major role in the adaptation to stressors, studying symbiosis might be of particular interest to study the adaptive potential and the resilience of organisms to stressors. For that purpose, experimental evolution constitutes a great tool to study the direct and evolved response to stressors, as well as the evolution of the symbiotic association under a controlled stressful environment (Hoang et al., 2016; Erkosar et al., 2017). Developing experimental and theoretical evolutionary studies can thus help to pinpoint molecular mechanisms at play when evolutionary forces act and to validate predictive mathematical models.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors made an intellectual contribution to conceive the mini-review. In addition, NK supervised its writing, illustration, and editing. AB contributed sections and illustrations. All authors edited the manuscript and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the JCJC grant RESIST (ANR-16-CE02-0013) funded by the French National Research Agency (ANR). This work was also supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon and within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007) operated by the ANR.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the two reviewers for their constructive comments.

- Baker, D. M., Freeman, C. J., Wong, J. C. Y., Fogel, M. L., and Knowlton, N. (2018). Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. *ISME J.* 12, 921–930. doi: 10.1038/s41396-018-0046-8
- Bharwani, A., Mian, M. F., Foster, J. A., Surette, M. G., Bienenstock, J., and Forsythe, P. (2016). Structural and functional consequences of chronic psychosocial stress on the microbiome and host. *Psychoneuroendocrinology* 63, 217–227. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.10.001
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., and Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 6:e1000833. doi: 10.1371/journal.ppat.1000833
- Bissett, A., Brown, M. V., Siciliano, S. D., and Thrall, P. H. (2013). Microbial community responses to anthropogenically induced environmental change: towards a systems approach. *Ecol. Lett.* 16, 128–139. doi: 10.1111/ele.12109
- Blanquer, A., Uriz, M. J., Cebrian, E., and Galand, P. E. (2016). Snapshot of a bacterial microbiome shift during the early symptoms of a massive sponge die-off in the western Mediterranean. *Front. Microbiol.* 7:752. doi: 10.3389/fmicb.2016.00752
- Caragata, E. P., Rancès, E., Hedges, L. M., Gofton, A. W., Johnson, K. N., O’Neill, S. L., et al. (2013). Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by *Wolbachia*. *PLoS Pathog.* 9:e1003459. doi: 10.1371/journal.ppat.1003459

- Cheng, Y. T., Zhang, L., and He, S. Y. (2019). Plant-microbe interactions facing environmental challenge. *Cell Host Microbe* 26, 183–192. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.009
- Clay, K. (2014). Defensive symbiosis: a microbial perspective. *Funct. Ecol.* 28, 293–298. doi: 10.1111/1365-2435.12258
- Colgan, A. M., Cameron, A. D., and Kröger, C. (2017). If it transcribes, we can sequence it: mining the complexities of host-pathogen-environment interactions using RNA-seq. *Curr. Opin. Microbiol.* 36, 37–46. doi: 10.1016/j.mib.2017.01.010
- Corbin, C., Heyworth, E. R., Ferrari, J., and Hurst, G. D. D. (2017). Heritable symbionts in a world of varying temperature. *Heredity (Edinb)* 118, 10–20. doi: 10.1038/hdy.2016.71
- Crain, C. M., Kroecker, K., and Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x
- Cunning, R., Muller, E. B., Gates, R. D., and Nisbet, R. M. (2017). A dynamic bioenergetic model for coral-Symbiodinium symbioses and coral bleaching as an alternate stable state. *J. Theor. Biol.* 431, 49–62. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.08.003
- de Lorge, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., et al. (2018). Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat. Commun.* 9:4215. doi: 10.1038/s41467-018-06659-3
- Dillon, R., and Charnley, K. (2002). Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.* 153, 503–509. doi: 10.1016/S0923-2508(02)01361-X
- Doremus, M. R., Kelly, S. E., and Hunter, M. S. (2019). Exposure to opposing temperature extremes causes comparable effects on *Cardinium* density but contrasting effects on *Cardinium* induced cytoplasmic incompatibility. *PLoS Pathog.* 15:e1008022. doi: 10.1371/journal.ppat.1008022
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.* 23, 38–47. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 17–34. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020822
- 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 Biol.* 5:e96. doi: 10.1371/journal.pbio.0050096
- Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., et al. (2018). Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr. Biol.* 28, 1896–1902.e5. doi: 10.1016/j.cub.2018.04.038
- Eirin-Lopez, J. M., and Putnam, H. M. (2019). Marine environmental epigenetics. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 11, 335–368. doi: 10.1146/annurev-marine-010318-095114
- Enders, L. S., and Miller, N. J. (2016). Stress-induced changes in abundance differ among obligate and facultative endosymbionts of the soybean aphid. *Ecol. Evol.* 6, 818–829. doi: 10.1002/ece3.1908
- Engl, T., Eberl, N., Gorse, C., Krüger, T., Schmidt, T. H. P., Plarre, R., et al. (2018). Ancient symbiosis confers desiccation resistance to stored grain pest beetles. *Mol. Ecol.* 27, 2095–2108. doi: 10.1111/mec.14418
- Erkosar, B., Kolly, S., van der Meer, J. R., and Kawecki, T. J. (2017). Adaptation to chronic nutritional stress leads to reduced dependence on microbiota in *Drosophila melanogaster*. *mBio* 8:e01496-17. doi: 10.1128/mBio.01496-17
- Erlacher, A., Cardinale, M., Grube, M., and Berg, G. (2015). Biotic stress shifted structure and abundance of *enterobacteriaceae* in the lettuce microbiome. *PLoS One* 10:e0118068. doi: 10.1371/journal.pone.0118068
- Faria, V. G., Martins, N. E., Schlötterer, C., and Sucena, É (2018). Readapting to DCV infection without Wolbachia: frequency changes of *Drosophila* antiviral alleles can replace endosymbiont protection. *Genome Biol. Evol.* 10, 1783–1791. doi: 10.1093/gbe/evy137
- Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* 36, 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x
- Ffrench-Constant, R. H., and Bass, C. (2017). Does resistance really carry a fitness cost? *Curr. Opin. Insect Sci.* 21, 39–46. doi: 10.1016/j.cois.2017.04.011
- Flórez, L. V., Biedermann, P. H. W., Engl, T., and Kaltenpoth, M. (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 32, 904–936. doi: 10.1039/c5np00010f
- Foucart, S. (2019). *Et le Monde Devint Silencieux: Comment L'agrochimie a Détruit les Insectes*. Seuil: Vie pratique & Loisirs.
- Gerardo, N. M., and Parker, B. J. (2014). Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: an ecological and evolutionary framework. *Curr. Opin. Insect Sci.* 4, 8–14. doi: 10.1016/j.cois.2014.08.002
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., and Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957. doi: 10.1126/science.1255957
- Gunderson, A. R., Armstrong, E. J., and Stillman, J. H. (2016). Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 8, 357–378. doi: 10.1146/annurev-marine-122414-033953
- Hamilton, P. T., Peng, F., Boulanger, M. J., and Perlman, S. J. (2016). A ribosome-inactivating protein in a *Drosophila* defensive symbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 350–355. doi: 10.1073/pnas.1518648113
- Hartman, K., and Tringe, S. G. (2019). Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress. *Biochem. J.* 476, 2705–2724. doi: 10.1042/BCJ20180615
- Henry, M., Becher, M. A., Osborne, J. L., Kennedy, P. J., Aupinel, P., Bretagnolle, V., et al. (2017). Predictive systems models can help elucidate bee declines driven by multiple combined stressors. *Apidologie* 48, 328–339. doi: 10.1007/s13592-016-0476-0
- Hillyer, K. E., Tumanov, S., Villas-Bôas, S., and Davy, S. K. (2016). Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *J. Exp. Biol.* 219, 516–527. doi: 10.1242/jeb.128660
- Hoang, K. L., Morran, L. T., and Gerardo, N. M. (2016). Experimental evolution as an underutilized tool for studying beneficial animal-microbe interactions. *Front. Microbiol.* 7:1444. doi: 10.3389/fmicb.2016.01444
- Hodgson, D., McDonald, J. L., and Hosken, D. J. (2015). What do you mean, "resilient"? *Trends Ecol. Evol.* 30, 503–506. doi: 10.1016/j.tree.2015.06.010
- Hopkins, S. R., Wojdak, J. M., and Belden, L. K. (2017). Defensive symbionts mediate host-parasite interactions at multiple scales. *Trends Parasitol.* 33, 53–64. doi: 10.1016/j.pt.2016.10.003
- Howells, E. J., Abrego, D., Meyer, E., Kirk, N. L., and Burt, J. A. (2016). Host adaptation and unexpected symbiont partners enable reef-building corals to tolerate extreme temperatures. *Glob. Chang. Biol.* 22, 2702–2714. doi: 10.1111/gcb.13250
- Huot, B., Castroverde, C. D. M., Velásquez, A. C., Hubbard, E., Pulman, J. A., Yao, J., et al. (2017). Dual impact of elevated temperature on plant defence and bacterial virulence in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 8:1808. doi: 10.1038/s41467-017-01674-2
- Jacob, P., Hirt, H., and Bendahmane, A. (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnol. J.* 15, 405–414. doi: 10.1111/pbi.12659
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S. N., Boelio, L. M., and Perlman, S. J. (2010). Adaptation via symbiosis: recent spread of a *drosophila* defensive symbiont. *Science* 329, 212–215. doi: 10.1126/science.1188235
- Johnson, N. C., Wilson, G. W. T., Bowker, M. A., Wilson, J. A., and Miller, R. M. (2010). Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2093–2098. doi: 10.1073/pnas.0906710107
- Kaltenpoth, M., Götter, W., Herzner, G., and Strohm, E. (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr. Biol.* 15, 475–479. doi: 10.1016/j.cub.2004.12.084
- Kandalepas, D., Blum, M. J., and Van Bael, S. A. (2015). Shifts in symbiotic endophyte communities of a foundational salt marsh grass following oil exposure from the deepwater horizon oil spill. *PLoS One* 10:e0122378. doi: 10.1371/journal.pone.0122378
- Kaunisto, S., Ferguson, L. V., and Sinclair, B. J. (2016). Can we predict the effects of multiple stressors on insects in a changing climate? *Curr. Opin. Insect Sci.* 17, 55–61. doi: 10.1016/j.cois.2016.07.001
- Kenney, A. D., Dowdle, J. A., Bozzacco, L., McMichael, T. M., Gelais, C., Panfil, A. R., et al. (2017). Human genetic determinants of viral diseases. *Annu. Rev. Genet.* 51, 241–263. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-023425
- Kiba, T., and Krapp, A. (2016). Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant Cell Physiol.* 57, 707–714. doi: 10.1093/pcp/pcw052

- Kiers, E. T., Palmer, T. M., Ives, A. R., Bruno, J. F., and Bronstein, J. L. (2010). Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecol. Lett.* 13, 1459–1474. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01538.x
- Kikuchi, Y., Tada, A., Musolin, D. L., Hari, N., Hosokawa, T., Fujisaki, K., et al. (2016). Collapse of insect gut symbiosis under simulated climate change. *mBio* 7:e01578-16. doi: 10.1128/mBio.01578-16
- Kliot, A., and Ghanim, M. (2012). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest. Manag. Sci.* 68, 1431–1437. doi: 10.1002/ps.3395
- Koehler, S., Doubtski, J., and Kaltenpoth, M. (2013). Dynamics of symbiont-mediated antibiotic production reveal efficient long-term protection for beewolf offspring. *Front. Zool.* 10:3. doi: 10.1186/1742-9994-10-3
- Lamiable, O., and Imler, J. L. (2014). Induced antiviral innate immunity in *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* 20, 62–68. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.006
- Lämke, J., and Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol.* 18, 1–11. doi: 10.1186/s13059-017-1263-6
- Larrainzar, E., and Wienkoop, S. (2017). A proteomic view on the role of legume symbiotic interactions. *Front. Plant Sci.* 8:1267. doi: 10.3389/fpls.2017.01267
- Latef, A. A. H. A., Hashem, A., Rasool, S., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Egamberdieva, D., et al. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: a review. *J. Plant Biol.* 59, 407–426. doi: 10.1007/s12374-016-0237-7
- Lemoine, M. M., Engl, T., and Kaltenpoth, M. (2020). Microbial symbionts expanding or constraining abiotic niche space in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 39, 14–20. doi: 10.1016/j.cois.2020.01.003
- Lesser, M. P., Fiore, C., Slattery, M., and Zaneveld, J. (2016). Climate change stressors destabilize the microbiome of the caribbean barrel sponge, *Xestospongia muta*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 475, 11–18. doi: 10.1016/j.jembe.2015.11.004
- Liess, M., Foit, K., Knillmann, S., Schäfer, R. B., and Liess, H. D. (2016). Predicting the synergy of multiple stress effects. *Sci. Rep.* 6:32965. doi: 10.1038/srep32965
- Martinez, A. J., Weldon, S. R., and Oliver, K. M. (2014). Effects of parasitism on aphid nutritional and protective symbioses. *Mol. Ecol.* 23, 1594–1607. doi: 10.1111/mec.12550
- Martinez, J., Cogni, R., Cao, C., Smith, S., Illingworth, C., and Jiggins, F. M. (2016). Addicted? Reduced host resistance in populations with defensive symbionts. *Proc. R. Soc. L. B Biol. Sci.* 283:20160778. doi: 10.1098/rspb.2016.0778
- Martinez, J., Ok, S., Smith, S., Snoeck, K., Day, J. P., and Jiggins, F. M. (2015). Should symbionts be nice or selfish? Antiviral effects of *Wolbachia* are costly but reproductive parasitism is not. *PLoS Pathog.* 11:e1005021. doi: 10.1371/journal.ppat.1005021
- Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., et al. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Front. Plant Sci.* 8:172. doi: 10.3389/fpls.2017.00172
- Metcalfe, C. J. E., and Koskella, B. (2019). Protective microbiomes can limit the evolution of host pathogen defense. *Evol. Lett.* 3, 534–543. doi: 10.1002/evl3.140
- Miller, R. N. G., Alves, G. S. C., and Van Sluys, M. A. (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Ann. Bot.* 119, 681–687. doi: 10.1093/aob/mcw284
- Miransari, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biol.* 12, 563–569. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00308.x
- Moné, Y., Monnin, D., and Kremer, N. (2014). The oxidative environment: a mediator of interspecies communication that drives symbiosis evolution review. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 281, 20133112. doi: 10.1098/rspb.2013.3112
- Monnin, D., Jackson, R., Kiers, E. T., Bunker, M., Eilers, J., and Henry, L. M. (2020). Parallel evolution in the integration of a co-obligate aphid symbiosis. *Curr. Biol.* 30, 1–9. doi: 10.2139/ssrn.3520958
- Monnin, D., Kremer, N., Berny, C., Henri, H., Dumet, A., Voituron, Y., et al. (2016). Influence of oxidative homeostasis on bacterial density and cost of infection in *Drosophila-Wolbachia* symbioses. *J. Evol. Biol.* 29, 1211–1222. doi: 10.1111/jeb.12863
- Moran, N. A., Plague, G. R., Sandström, J. P., and Wilcox, J. L. (2003). A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14543–14548. doi: 10.1073/pnas.2135345100
- Moreira, L., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., et al. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and plasmodium. *Cell* 139, 1268–1278. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042
- Munns, R. (2011). “Plant adaptations to salt and water stress. Differences and commonalities. Plant response to drought and salinity: developments in a post-genomic era,” in *Advances in Botanical Research*, Vol. 53, ed. I. Turkan (London: Academic Press), doi: 10.1016/B978-0-12-387692-8.00001-1
- Muturi, E. J., Bara, J. J., Rooney, A. P., and Hansen, A. K. (2016). Midgut fungal and bacterial microbiota of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* shift in response to La Crosse virus infection. *Mol. Ecol.* 25, 4075–4090. doi: 10.1111/mec.13741
- Obbard, D. J., and Dudas, G. (2014). The genetics of host-virus coevolution in invertebrates. *Curr. Opin. Virol.* 8, 73–78. doi: 10.1016/j.coviro.2014.07.002
- Oliver, K. M., Degnan, P. H., Hunter, M. S., and Moran, N. A. (2009). Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science* 325, 992–994. doi: 10.1126/science.1174463
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., and Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1803–1807. doi: 10.1073/pnas.0335320100
- Olofsson, T. C., Butler, É, Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., and Vásquez, A. (2016). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int. Wound J.* 13, 668–679. doi: 10.1111/iwj.12345
- O’Neal, S. T., Anderson, T. D., and Wu-Smart, J. Y. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26, 57–62. doi: 10.1016/j.cois.2018.01.006
- Palmer, C. V., and Traylor-Knowles, N. (2012). Towards an integrated network of coral immune mechanisms. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 4106–4114. doi: 10.1098/rspb.2012.1477
- Palmer-Young, E. C., Raffel, T. R., and McFrederick, Q. Z. (2019). pH-mediated inhibition of a bumble bee parasite by an intestinal symbiont. *Parasitology* 146, 380–388. doi: 10.1017/S0031182018001555
- Paxton, C. W., Davy, S. K., and Weis, V. M. (2013). Stress and death of cnidarian host cells play a role in cnidarian bleaching. *J. Exp. Biol.* 216, 2813–2820. doi: 10.1242/jeb.087858
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., and Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A., and Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* 6:46. doi: 10.1186/s40168-018-0428-1
- Polin, S., Simon, J. C., and Outreman, Y. (2014). An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecol. Evol.* 4, 826–830. doi: 10.1002/ece3.991
- Putnam, H. M., Barott, K. L., Ainsworth, T. D., and Gates, R. D. (2017). The vulnerability and resilience of reef-building corals. *Curr. Biol.* 27, R528–R540. doi: 10.1016/j.cub.2017.04.047
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X., and Yuan, Z. (2016). Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnol. Adv.* 34, 1245–1259. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.005
- Råberg, L., Graham, A. L., and Read, A. F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 37–49. doi: 10.1098/rstb.2008.0184
- Ravussin, Y., Koren, O., Spor, A., Leduc, C., Gutman, R., Stombaugh, J., et al. (2012). Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity* 20, 738–747. doi: 10.1038/oby.2011.111
- Renoz, F., Pons, I., and Hance, T. (2019). Evolutionary responses of mutualistic insect-bacterial symbioses in a world of fluctuating temperatures. *Curr. Opin. Insect Sci.* 35, 20–26. doi: 10.1016/j.cois.2019.06.006
- Rio, R. V. M., Attardo, G. M., and Weiss, B. L. (2016). Grandeur alliances: symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. *Trends Parasitol.* 32, 739–749. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040
- Rocca, J. D., Simonin, M., Blaszczyk, J. R., Ernakovich, J. G., Gibbons, S. M., Midani, F. S., et al. (2019). The microbiome stress project: toward a global meta-analysis of environmental stressors and their effects on microbial communities. *Front. Microbiol.* 10:3272. doi: 10.3389/fmicb.2018.03272
- Rodríguez, P. A., Rothballer, M., Chowdhury, S. P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., and Falter-Braun, P. (2019). Systems biology of plant-microbiome interactions. *Mol. Plant* 12, 804–821. doi: 10.1016/j.molp.2019.05.006

- Rymer, T. L., Pillay, N., and Schradin, C. (2016). Resilience to droughts in mammals: a conceptual framework for estimating vulnerability of a single species. *Q. Rev. Biol.* 91, 133–176. doi: 10.1086/686810
- Santos-Medellín, C., Edwards, J., Liechty, Z., Nguyen, B., and Sundaresan, V. (2017). Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes. *mBio* 8:e00764-17. doi: 10.1128/mBio.00764-17
- Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J. Exp. Biol.* 217, 23–34. doi: 10.1242/jeb.089722
- Sewelam, N., Kazan, K., and Schenk, P. M. (2016). Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant Sci.* 7:187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
- Shapira, M. (2016). Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* 31, 539–549. doi: 10.1016/j.tree.2016.03.006
- Shigenobu, S., and Wilson, A. C. C. (2011). Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1297–1309. doi: 10.1007/s00018-011-0645-2
- Silverstein, R. N., Cunniff, R., and Baker, A. C. (2015). Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Glob. Chang. Biol.* 21, 236–249. doi: 10.1111/gcb.12706
- 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. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.012
- Sudakaran, S., Kost, C., and Kaltenpoth, M. (2017). Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends Microbiol.* 25, 375–390. doi: 10.1016/j.tim.2017.02.014
- Suggett, D. J., Warner, M. E., and Leggat, W. (2017). Symbiotic dinoflagellate functional diversity mediates coral survival under ecological crisis. *Trends Ecol. Evol.* 32, 735–745. doi: 10.1016/j.tree.2017.07.013
- Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6:e2. doi: 10.1371/journal.pbio.1000002
- Thurber, R. V., Willner-Hall, D., Rodriguez-Mueller, B., Desnues, C., Edwards, R. A., Angly, F., et al. (2009). Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ. Microbiol.* 11, 2148–2163. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01935.x
- Tsuchida, T., Koga, R., Shiba, H., Matsumoto, T., and Fukatsu, T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.* 11, 2123–2135. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01606.x
- Van Dam, J. W., Uthicke, S., Beltran, V. H., Mueller, J. F., and Negri, A. P. (2015). Combined thermal and herbicide stress in functionally diverse coral symbionts. *Environ. Pollut.* 204, 271–279. doi: 10.1016/j.envpol.2015.05.013
- Vigneron, A., Masson, F., Vallier, A., Balmant, S., Rey, M., Vincent-Monégat, C., et al. (2014). Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Curr. Biol.* 24, 2267–2273. doi: 10.1016/j.cub.2014.07.065
- Vihervaara, A., Duarte, F. M., and Lis, J. T. (2018). Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat. Rev. Genet.* 19, 385–397. doi: 10.1038/s41576-018-0001-6
- Webster, N. S., and Reusch, T. B. H. (2017). Microbial contributions to the persistence of coral reefs. *ISME J.* 11, 2167–2174. doi: 10.1038/ismej.2017.66
- Weis, V. M. (2019). Cell biology of coral symbiosis: foundational study can inform solutions to the coral reef crisis. *Integr. Comp. Biol.* 59, 845–855. doi: 10.1093/icb/icz067
- Wernegreen, J. J. (2013). Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 255–262. doi: 10.1016/j.mib.2012.02.001.Mutualism
- Wernegreen, J. J., and Wheeler, D. E. (2009). Remaining flexible in old alliances: functional plasticity in constrained mutualisms. *DNA Cell Biol.* 28, 371–381. doi: 10.1089/dna.2009.0872
- Werner, G. D. A., and Kiers, E. T. (2015). Partner selection in the mycorrhizal mutualism. *New Phytol.* 205, 1437–1442. doi: 10.1111/nph.13113
- Werner, G. D. A., Strassmann, J. E., Ivens, A. B. F., Engelmoer, D. J. P., Verbruggen, E., Queller, D. C., et al. (2014). Evolution of microbial markets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 1237–1244. doi: 10.1073/pnas.1315980111
- Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., et al. (2016). Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J.* 10, 2557–2568. doi: 10.1038/ismej.2016.45
- Williams, B., Landay, A., and Presti, R. M. (2016). Microbiome alterations in HIV infection: a review. *Cell. Microbiol.* 18, 645–651. doi: 10.1111/cmi.12588
- Zaneveld, J. R., McMinds, R., and Thurber, R. V. (2017). Stress and stability: applying the anna karenina principle to animal microbiomes. *Nat. Microbiol.* 2:17121. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.121
- 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. *Nat. Commun.* 8:14213. doi: 10.1038/ncomms14213

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bénard, Vavre and Kremer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.