

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Écologie et biologie des interactions - EBI
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac
Secteur de recherche : Biologie des organismes

Présentée par :
Winka Le Clec'h

Transferts horizontaux des Wolbachia chez les isopodes terrestres : conséquences immédiates et évolutives chez les hôtes et les symbiotes

Directeur(s) de Thèse :
Mathieu Sicard, Didier Bouchon

Soutenue le 05 décembre 2012 devant le jury

Jury :

Président	Jean-Baptiste Ferdy	Professeur des Universités - Université Toulouse 3
Rapporteur	Fabrice Vavre	Directeur de recherche CNRS - Université de Lyon 1
Rapporteur	Marylène Poirie	Professeur des Universités - Université de Nice-Sophia Antipolis
Membre	Mathieu Sicard	Maître de conférences - Université de Poitiers
Membre	Didier Bouchon	Professeur des Universités - Université de Poitiers
Membre	Franck Dedeine	Maître de conférences - Université de Tours

Pour citer cette thèse :

Winka Le Clec'h. *Transferts horizontaux des Wolbachia chez les isopodes terrestres : conséquences immédiates et évolutives chez les hôtes et les symbiotes* [En ligne]. Thèse Biologie des organismes. Poitiers : Université de Poitiers, 2012. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

UNIVERSITÉ DE POITIERS

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Poitiers

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : **Biologie de l'Environnement, des Populations, Écologie**

préparée au laboratoire **Ecologie et Biologie des Interactions**

dans le cadre de l'École Doctorale **Sciences pour l'environnement Gay Lussac**

présentée et soutenue publiquement par

Winka LE CLEC'H

le 05 décembre 2012

**Transferts horizontaux des *Wolbachia* chez les isopodes
terrestres : conséquences immédiates et évolutives chez les
hôtes et les symbiotes**

Directeur de thèse : **Mathieu SICARD**

Co-directeur de thèse : **Didier BOUCHON**

JURY

Pr. M. POIRIÉ	Professeur des Universités - Nice	Rapporteur
Dr. F. VAVRE	Directeur de Recherche CNRS - Lyon	Rapporteur
Pr. D. BOUCHON	Professeur des Universités - Poitiers	Examineur
Dr. F. DEDEINE	Maître de Conférences - Tours	Examineur
Pr. J.B. FERDY	Professeur des Universités - Toulouse	Examineur
Dr. M. SICARD	Maître de Conférences - Poitiers	Examineur

«Vivrais-je vingt années de plus, et serais-je en état de travailler, comme je modifierais *L'Origine*, et comme mes idées sur chaque point seraient différentes ! Mais après tout, c'est un début, et c'est déjà quelque chose...»

Charles Darwin

A ma Famille

A Frédéric

Remerciements

ENFIN voici venu le moment tant attendu des remerciements!! Vous me direz, après trois années de thèse, d'écriture de comptes rendus et de résumés, d'élaboration de diaporamas, de rédaction de publications scientifiques et celle de ce manuscrit, quoi de plus simple que d'écrire ce petit interlude au fil de la plume, en toute liberté... Et je m'entendrai vous répondre que ce n'est pas chose si aisée car nous désirons tous réussir au mieux ce morceau de bravoure, couronnement du manuscrit scientifique... Alors je vais essayer de donner le meilleur de moi même dans ce moment littéraire, essayer de n'oublier personne dans ces remerciements et surtout de traduire au plus juste tous les sentiments qui m'assaillent lorsque je repense au chemin parcouru...

Qui remercier en premier si ce n'est mes directeurs de thèse, Mathieu Sicard et Didier Bouchon. Vous m'avez donné la chance de travailler à vos côtés sur un sujet plus que passionnant et sur lequel tant de choses sont encore à faire et à découvrir! Mathieu, un immense merci pour tout ce que tu as pu m'apporter sur le plan scientifique, pour cet excellent projet sur lequel tu m'as permis de travailler durant ces trois années, pour ton dynamisme, tes idées omniprésentes, ta maîtrise de tant de concepts, ton argumentation souvent sans faille et ton esprit critique ainsi que pour tous ces échanges qui ont indéniablement contribué à la réussite de cette thèse! Merci également à Didier pour toutes tes corrections, relectures et conseils sur tous nos articles et ce manuscrit et pour nos discussions au sujet des fonctions graphiques de R

et leurs multiples arguments ainsi que sur ce vaste domaine que sont les statistiques.

Je tiens également à remercier chaleureusement Franck Dedeine, Jean-Baptiste Ferdy, Marylène Poirié et Fabrice Vavre pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger de mon travail de thèse, malgré vos emplois du temps plus que chargés ! Franck et Jean-Baptiste, merci pour nos discussions lors de mes comités de thèse, pour vos remarques, vos idées, vos propositions et conseils qui m'ont aiguillés tout au long de ce travail. Jean-Baptiste, tu auras su, en quelques mots, lever le voile sur des années de mystères statistiques et je crois que je ne t'en remercierai jamais assez même si la statistique garde toujours sa petite part d'ombre, ce qui fait son charme !

Je souhaiterais dire un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour ces deux années de master et ces trois ans de thèse passés (si vite !) à vos côtés, pour votre accueil, votre bonne humeur, vos conseils sur tous les aspects de la vie scientifique. Je tiens à remercier particulièrement Christine, tant pour ses relectures de notre premier article que pour celles de ce manuscrit, pour nos collaborations ainsi que pour ses conseils et son humour unique ; merci également à Freddie-Jeanne pour m'avoir aiguillée lors de l'établissement des protocoles comportementaux ; à Joanne pour m'avoir tout enseigné de la FISH sur hémocytes et pour sa participation aux relectures de notre troisième article ainsi qu'à Sophie qui a si gentiment accepté de partager ses précieuses connaissances concernant un petit trématode nommé Schistosome et de corriger mon projet pour l'avenir (autrement appelé Post-doc) !

Merci également à toute l'équipe technique, Carine, Catherine (pour nos petites discussions autour d'un repas de midi ou lors de mes si nombreuses injections de cloportes), Jérôme, Gaëtan, Tiffany (pour toutes nos discussions et ton aide plus que précieuse lors de la mise en place des TP) et Alexandra. Non Maryline, rassure toi, je ne t'ai pas oubliée, comment le pourrais-je !! Toi qui m'as tout enseigné, dès

mon stage de Master 1, de la biologie moléculaire, cellulaire, de la manipulation des isopodes terrestres et j'en passe ! Toi avec qui j'ai passé tant d'heures à injecter des *Wolbachia* à nos chers cloportes, avec qui j'ai tant aimé travaillé, jamais je ne pourrai t'oublier et ce travail est aussi en partie le tien ! Isabelle G., toi non plus je ne t'ai pas oubliée ! Merci Isa pour m'avoir si gentiment hébergée à Massy lors de mon « tour de France en 3 jours » juste avant que je ne débute cette thèse, pour toutes nos discussions, les soirées ainsi que les sorties natures !! Un grand merci également à Christelle, notre secrétaire de choc, si compétente, accueillante et toujours à l'écoute ! Et à toi Awa pour ta gentillesse et ta bonne humeur !

Merci à toutes mes chères collègues du bureau des « étudiants » : Jessica, Lise, Myriam et Sandrine pour toutes nos discussions, nos pauses bonbons, les soirées et tous les moments de détente qui nous font oublier le stress du quotidien ! Bon courage à vous pour la suite !! Merci également aux petits nouveaux, Bianca, Bouziane, Magali et Victorien et aux anciens, ceux qui sont partis vers d'autres horizons : Benjamin, Elmina, Dalila, Gipo, Hajer, Lenka, Medhia, Nicolas, Vincent, Sam ; ceux qui ne sont pas encore partis mais qui s'envoleront bientôt, n'est-ce pas Gael ;-) ? ! Et ceux qui n'ont pas pu s'empêcher de revenir : Mauricio et Sébastien !

Je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée émue pour tous mes petits *Porcellio dilatatus dilatatus*, *Armadillidium vulgare* et *Armadillo officinalis* et toutes les *Wolbachia* qui se sont donnés corps et âmes pour la science ! Après tout ce que je vous ai fait subir, ces quels mots ne sont, pour vous, que justice !

Je tiens enfin à remercier mes parents, sans qui rien de cela n'aurait pu être possible, pour leur soutien sans faille et tout leur amour. Un grand merci également à ma petite sœur ! Merci ma Kiki pour toutes nos soirées, pour ton humour décapant, tes trouvailles vidéos et tellement d'autres choses encore ! Merci d'être là, nous avons

bien rattrapé le temps perdu !

Et enfin, merci à toi mon amour pour tout ces moments de bonheur vécu à deux et tous ceux à venir sous le soleil du Texas, pour ton amour, ton soutien sans faille, ton optimisme et tant d'autres choses encore!! Sans toi, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui et je te dois tellement, tant sur le plan scientifique (que d'idées, que d'idées!!), que technique et analytique (toi qui m'a initié à nos chers amis Ubuntu, R et L^AT_EX!! L'élève n'a pas encore dépassée le maître mais espère bien l'égaliser un jour!), tu mérites amplement ta dédicace mon pitchouk ;-))!!

A tous, mille mercis. Il est désormais temps pour l'oiseau de quitter le nid et de s'envoler vers de nouvelles et lointaines aventures scientifiques...

Résumé

Les bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* se transmettent verticalement de la mère aux descendants mais également horizontalement d'un hôte arthropode à l'autre. Chez les isopodes terrestres, les *Wolbachia* montrent une diversité et une prévalence élevées et bouleversent la reproduction de leurs hôtes en féminisant les mâles ou en induisant des incompatibilités de croisements.

Nous avons utilisé la diversité de ces souches de *Wolbachia* pour étudier leur plasticité en terme de changement d'hôte et l'évolution de leur virulence. Nos résultats montrent la grande plasticité des *Wolbachia*, s'installant chez tous les hôtes testés. Par ailleurs, un transfert horizontal est possible à partir de différentes sources tissulaires : ovaires et hémocytes ainsi que lors de la prédation d'un individu infecté. De plus, les transferts horizontaux aux échelles intra comme interspécifique peuvent modifier la nature des interactions entre *Wolbachia* et leurs hôtes et mener à une relation de type hôte-pathogène. Ce type d'interaction a été spécifiquement exploré pour comprendre les mécanismes impliqués dans les changements de virulence. Nous avons démontré que la réponse autophagique de l'hôte contre *Wolbachia* pouvait jouer un rôle majeur dans la nature pathogène de l'interaction. De plus, par une approche d'évolution expérimentale, nous montrons que *Wolbachia* peut devenir pathogène pour son hôte natif chez qui elle est habituellement peu virulente. En détournant les *Wolbachia* de leur voie de transmission verticale et en les transmettant uniquement de manière horizontale, elles deviennent beaucoup plus invasives et tuent leur hôte.

Abstract

Wolbachia are basically endosymbiotic bacteria, vertically transmitted from mother to offspring. However, they can also pass horizontally from one arthropod host to another. Among terrestrial isopods, the *Wolbachia* exhibit high diversity and prevalence and disturb their host reproduction by feminizing males into females or inducing crossing incompatibilities.

We took advantage of this diversity of *Wolbachia* in terrestrial isopods to study their plasticity through hosts switching and the evolution of their virulence. Our results highlighted their huge plasticity as they were capable of settling in all the tested terrestrial isopods hosts. These horizontal transfers can be performed with different tissues as a source of *Wolbachia* : Ovaries and hemocytes, but also when an uninfected host preyed an infected one. Moreover, horizontal transfers can modify the nature of the interaction between *Wolbachia* and their hosts moving towards a host-pathogen relationship. We further explored such conflicting interactions in order to investigate the reasons of the changes in virulence. We demonstrated that the host autophagic response against *Wolbachia* can turn against the host itself and making the symbiont a pathogen. Moreover, by using experimental evolution, we revealed that *Wolbachia* could increase in virulence against the native host it normally does not harm in a context of vertical transmission. When we disrupted the vertical transmission mode in order to exclusively transmit *Wolbachia* by horizontal contagious mode, they became much more invasive and rapidly killed their native host.

Sommaire

Remerciements	5
Résumé	9
Abstract	10
Liste des figures	19
Liste des tableaux	23
Liste des abréviations	25

I Introduction générale : Virulence de *Wolbachia* et transferts horizontaux **27**

1 Les interactions symbiotiques	29
1.1 Généralités sur la symbiose	29
1.2 La transmission, élément clef de l'évolution de la symbiose . . .	31
1.2.1 La Transmission horizontale	31
1.2.2 La Transmission verticale	32
1.2.3 Lorsque transmission verticale et horizontale coexis- tent...	33
1.3 Les compromis transmission/virulence	34
2 Les <i>Wolbachia</i> , symbiotes ubiquistes des arthropodes	35
2.1 Les <i>Wolbachia</i>	35
2.2 <i>Wolbachia</i> , un endosymbiote manipulateur...	38
2.2.1 L'incompatibilité cytoplasmique (IC)	38
2.2.2 La pathenogenèse thélytoque	39

2.2.3	La mort des mâles	39
2.2.4	La féminisation	40
2.3	De la transmission maternelle au transfert horizontal	40
3	Le coût de l'infection par <i>Wolbachia</i>	43
3.1	Un symbiote bénéfique	45
3.2	Des tendances parasitaires...	46
3.3	De la liberté à la dépendance : qui emprisonne qui ?	48
4	Niveau de virulence et transfert horizontal...	49
5	Présentation de la problématique	53

II Transfert horizontal de *Wolbachia* : Lorsque la symbiose tourne à la pathologie... 55

1	Introduction	57
	High virulence of <i>Wolbachia</i> after host switching : When autophagy hurts.	59
2	Conclusion	71

III De la plasticité chez les *Wolbachia* 75

1 Lorsque les *Wolbachia* rencontrent l'isopode terrestre *Porcellio dilatatus dilatatus* 79

1	Introduction	79
	From horizontal to vertical symbiont transmission : Multiple <i>Wolbachia</i> strains forced to live with a new host.	80
1.1	Introduction	80
1.2	Materials and Methods	85
1.2.1	Biological materials	85
1.2.2	<i>Wolbachia</i> injection experiments	85
1.2.3	Measurements of life history traits	86

1.2.4	F1 progenies from injected females	86
1.2.5	<i>Wolbachia</i> quantification	87
1	<i>Tissue samples and DNA extraction</i>	87
2	<i>Quantification of Wolbachia in host's tissues by qPCR</i>	87
1.2.6	Statistical analysis	88
1.3	Results	91
1.3.1	Alteration of <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits by <i>wVulC</i> , <i>wVulM</i> and <i>wPruIII</i>	91
1	<i>Gain of weight</i>	91
2	<i>Mobility</i>	93
3	<i>Burying behaviour</i>	95
4	<i>Survival</i>	95
1.3.2	Size and sex ratios in the F1 broods from mothers injected with <i>Wolbachia</i>	98
1.3.3	<i>Wolbachia</i> quantification in organs of native donor hosts, injected <i>P. d. dilatatus</i> and their F1 progenies	100
1.4	Discussion	103
1.4.1	Acknowledgments	108
2	Conclusion du Chapitre 1	110
2	Existe-t'il une réelle différence de virulence entre <i>wVulC</i> et <i>wVulM</i> ?	115
1	Introduction	115
	Differential impacts of two <i>Wolbachia</i> strains on the same host	
	after transinfection : strain or dose effects ?	117
1.1	Introduction	117
1.2	Materials and Methods	119
1.2.1	Biological materials	119
1.2.2	Injections of <i>Wolbachia</i> from ovaries or hemolymph .	120
1.2.3	Life history traits measurements	121

1.2.4	Tissue samples and DNA extractions for <i>Wolbachia</i> quantifications	122
1.2.5	Quantification of <i>Wolbachia</i> in host's tissues by quantitative PCR	122
1.2.6	Statistical analysis	123
1.3	Results	125
1.3.1	Global alterations of <i>P. d. dilatatus</i> life history traits following transinfections	125
1.3.2	<i>wVulC</i> causes stronger alterations than <i>wVulM</i> . . .	125
1.3.3	A dose effect for both <i>Wolbachia</i> strains	129
1.3.4	Impact of the source of <i>Wolbachia</i> : hemolymph versus crushed ovaries	129
1.3.5	<i>Wolbachia</i> quantification in the ovaries, CNS and hemocytes	130
1.4	Discussion	132
1.4.1	Acknowledgments	136
2	Conclusion du Chapitre 2	137
3	Un petit tour chez les isopodes terrestres <i>Armadillidium vulgare</i> et <i>Armadillo officinalis</i>...	141
1	Introduction	141
2	Quels impacts des <i>Wolbachia</i> sur les traits d'histoire de vie d' <i>A. vulgare</i> ?	142
3	Une colonisation de tous les tissus hôtes	146
4	Hypothèses quant à la défaillance de la transmission verticale	146
5	<i>Wolbachia</i> , entre plasticité et virulence	148
	Box : Les <i>Wolbachia</i> sont-elles capables d'infecter l'isopode terrestre <i>Armadillo officinalis</i> ?	150
6	Conclusion générale sur la Partie III	154

IV *Wolbachia* et ses chemins de traverse : Ou comment acquérir un endosymbiote suite à son repas.... 157

1	Introduction	159
---	------------------------	-----

Cannibalism and predation : A new ecological route for *Wolbachia*

	horizontal transmission in woodlice ?	161
--	---	-----

1.1	Introduction	161
-----	------------------------	-----

1.2	Materials and Methods	163
-----	---------------------------------	-----

1.2.1	Biological materials	163
-------	--------------------------------	-----

1.2.2	Cannibalism and predation experiments	163
-------	---	-----

1.2.3	Tissue samples and DNA extractions for <i>Wolbachia</i> quantifications	164
-------	---	-----

1.2.4	Quantification of <i>Wolbachia</i> in host's tissues by quantitative PCR	164
-------	--	-----

1.2.5	<i>Wolbachia</i> localization in "predator" hemocytes using Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH)	165
-------	--	-----

1.2.6	Statistical analysis	165
-------	--------------------------------	-----

1.3	Results	166
-----	-------------------	-----

1.3.1	<i>Wolbachia</i> quantifications into the different host tissues of "predators"	166
-------	---	-----

1.3.2	Detection of <i>Wolbachia</i> in the "predator" hemocytes from both species using Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH)	168
-------	--	-----

1.4	Discussion	168
-----	----------------------	-----

1.4.1	Acknowledgments	173
-------	---------------------------	-----

2	Conclusion	174
---	----------------------	-----

V Evolution expérimentale de *Wolbachia* où comment devenir pathogène pour son hôte natif. 177

1	Introduction	179
2	Mise en place de l'évolution expérimentale	182
3	Résultats	185
3.1	Densités de <i>Wolbachia</i> présentes dans les tissus des hôtes au cours de l'évolution expérimentale	185
3.2	Augmentation du nombre d'hémocytes infectés au cours des transferts expérimentaux	186
3.3	Impact des ces transferts expérimentaux sur la survie des individus infectés	190
3.4	<i>Wolbachia</i> est-elle l'unique bactérie sélectionnée au cours de l'évolution expérimentale ?	191
3.5	Y-a-t'il eu évolution de la virulence de <i>Wolbachia</i> au cours de l'évolution expérimentale ?	194
4	Discussion	194

VI Discussion générale 199

VII Matériels et Méthodes 215

1	Matériel biologique	217
2	Prélèvement du matériel biologique	219
2.1	Prélèvement de l'hémolymphe	219
2.2	Prélèvement des gonades et de la chaîne nerveuse ventrale	220
3	Protocole de préparation des inocula et injection des animaux	220
3.1	Préparation d'un inoculum bactérien	220
3.1.1	A partir de tissus infectés broyés	220
3.1.2	À partir d'hémolymphe	221

3.2	Injection de l'inoculum chez les isopodes terrestres	221
4	Mesures phénotypiques réalisées chez les animaux injectés	222
4.1	Comportement d'enfouissement	222
4.2	Survie	222
4.3	Activité locomotrice	222
4.4	Prise de poids	223
5	Extraction d'ADN des différents tissus prélevés	223
6	Quantification de <i>Wolbachia</i> dans les tissus par PCR quantitative . .	224
7	Amplification du gène 16 S ARNr par PCR pour la migration TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) (en collaboration avec J. Dittmer)	225
8	Détermination des communautés bactériennes par TGGE	226
9	Identification des bandes obtenues en TGGE par clonage puis séquençage	227
10	Microscopie électronique à transmission	227
11	Détection des processus autophagiques par marquage anticorps LC3B	228
12	Fixation et hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) sur hémocytes	230
12.1	Fixation des hémocytes sur lame traitée à la polylysine	230
12.2	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) sur les hémocytes fixés	230
Bibliographie		235
VIII Annexes : Lorsque <i>Wolbachia</i> et les cloportes colonisent la toile...		265

Liste des figures

I-1	Position phylogénétique de <i>Wolbachia</i>	36
I-2	Les différents supergroupes des <i>Wolbachia</i>	37
I-3	Phylogénies des souches de <i>Wolbachia</i> appartenant au supergroupe B, basée sur les séquences du gène <i>wsp</i> , obtenu à partir d'une analyse du Minimum d'évolution.	44
III-1	Gain of weight for <i>Porcellio d. dilatatus</i> (A) females and (B) males during 200 days post-injection.	92
III-2	Mobility time over 180 s observations of <i>Porcellio d. dilatatus</i> (A) females and (B) males during 200 days post-injection.	93
III-3	Variation in the number of <i>Porcellio d. dilatatus</i> buried or at the surface.	96
III-4	Survival curve plots of <i>Porcellio d. dilatatus</i> during 200 days post-injection.	98
III-5	Size (A) and sex-ratio (B) of the brood from injected <i>P. d. dilatatus</i> mothers.	99
III-6	<i>Wolbachia</i> loads in ovaries (A), nerve cords (B) and hemocytes (C) of native hosts, injected <i>Porcellio d. dilatatus</i> females and their F1 progenies.	101
III-7	Supplementary data : Micrograph of nerve cells of <i>Porcellio d. dilatatus</i> injected by <i>wVulC</i> , <i>wVulM</i> and <i>wPruIII</i> at 60 days post-injection. These cells are localised in the nerve cord ganglion. . . .	106

III-8	Effects of the two <i>Wolbachia</i> strains <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> , injected at gradual doses, on the <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits.	126
III-9	Effects of the two <i>Wolbachia</i> strains <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> , injected with infected hemolymph, on the <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits.	128
III-10	Comparison of the <i>Wolbachia</i> load into <i>P. d. dilatatus</i> ' ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes for each strain and doses injected from crushed ovaries.	131
III-11	Comparison of the <i>Wolbachia</i> load into <i>P. d. dilatatus</i> ' ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes for each strain injected at the same dose from hemolymph and from crushed ovaries.	133
III-12	Suivis des traits d'histoire de vie d' <i>A. vulgare</i> suite aux injections de 8 souches de <i>Wolbachia</i> d'isopodes terrestres.	143
III-13	Densités des différentes souches de <i>Wolbachia</i> (nombre de copies du gène <i>wsp</i> /ng d'ADN) dans les trois types de tissus testés chez le receveur <i>A. vulgare</i> et comparaison avec les taux de présence des souches bactériennes dans les mêmes organes des hôtes natifs.	147
III-14	Taux d'infection des tissus ovariens, nerveux et immunitaires par les souches de <i>Wolbachia</i> <i>wVulC</i> , <i>wCon</i> , <i>wDil</i> et <i>wHel</i> chez des femelles <i>A. officinalis</i> transfectées à partir d'hémolymph provenant d'individus infectés (en nombre de copies <i>wsp</i> /ng ADN total).	152
IV-1	<i>Wolbachia</i> loads in CNS, ovaries and hemocytes of the "predators" <i>Porcellio d. dilatatus</i> and <i>Armadillidium vulgare</i>	167
IV-2	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH) detection of <i>Wolbachia</i> in circulating hemocytes of the "predators" <i>Porcellio d. dilatatus</i> and <i>Armadillidium vulgare</i> at 180 days post-ingestion.	169
V-1	Schématisation du protocole d'évolution expérimentale de la souche de <i>Wolbachia</i> <i>wVulC</i> chez son hôte natif <i>A. vulgare</i>	184

V-2	Quantification bactérienne dans les hémocytes, la chaîne nerveuse et les ovaires d' <i>A. vulgare</i> , pour chaque lignée expérimentale lors de chacun des transferts.	187
V-3	Pourcentage d'hémocytes d' <i>A. vulgare</i> infectés par <i>Wolbachia</i> pour chacune des lignées et transferts expérimentaux.	188
V-4	Détection des <i>Wolbachia</i> dans les hémocytes d' <i>A. vulgare</i> via l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) pour trois transferts expérimentaux (A : t1, B : t2 and C, D : t3).	189
V-5	Impact des transferts expérimentaux sur la survie des <i>A. vulgare</i> infectés.	192
V-6	Gel d'électrophorèse réalisé sur gradient de température (TGGE) des échantillons ADN d'hémolymphes d' <i>A. vulgare</i> obtenus pour chacune des lignées et transferts expérimentaux.	193
VII-1	Schéma de l'organisation générale et point de ponction de l'hémolymphes pour <i>A. vulgare</i> et <i>P. d. dilatatus</i>	219

Liste des tableaux

I-1	Souches de <i>Wolbachia</i> transférées horizontalement chez trois espèces d'isopodes terrestres : <i>Porcellio dilatatus dilatatus</i> , <i>Armadillidium vulgare</i> et <i>Armadillo officinalis</i>	52
III-1	<i>Wolbachia</i> strains used for horizontal transfers in the recipient host <i>P. d. dilatatus</i>	84
III-2	Percentage of females <i>P. d. dilatatus</i> with offspring when injected with different <i>Wolbachia</i> strains.	87
III-3	Effect of the injection of 8 different <i>Wolbachia</i> strains on <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits.	90
III-4	Comparison between the effect of <i>wVulC</i> , <i>wVulM</i> and <i>wPruIII</i> on <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits at 75 days post-injection.	94
III-5	Comparisons of <i>Wolbachia</i> densities between native donor hosts, injected <i>P. d. dilatatus</i> and F1 offsprings (animals from injected mother) in gonads, nervous tissues and hemocytes.	102
III-6	Transmission rate of the different <i>Wolbachia</i> strains to <i>P. d. dilatatus</i> progenies.	102
III-7	Global Effects of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> on <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits injected at different doses with crushed ovaries suspension or hemolymph.	124
III-8	Comparison between the effect of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> on <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits at 60 days PI when they are injected at the same doses.	127

III-9	Impact of different injected doses of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> on <i>P. d. dilatatus</i> 's life history traits at 60 days PI.	129
III-10	Comparison of the <i>Wolbachia</i> densities into <i>P. d. dilatatus</i> ' ovaries, CNS and hemocytes after injection of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> from crushed ovaries at 60 days post-injection.	130
III-11	Comparison of the <i>Wolbachia</i> densities into <i>P. d. dilatatus</i> ' ovaries, CNS and hemocytes after injection of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i> from hemolymph at 30 days post-injection.	132
III-12	Impacts sur les traits d'histoire de vie d' <i>A. vulgare</i> des huit souches de <i>Wolbachia</i> injectées.	145

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
bp	base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
CI	Cytoplasmic incompatibility
CNS	Central Nervous System
Com. pers.	Communication personnelle
DAPI	Diamidino-2-phénylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IC	Incompatibilité cytoplasmique
LD	Light/Dark (défini pour une photopériode)
M	Molaire
mL	millilitre
ng	nanogramme
OD	Optical density

pb	Paires de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pers. com.	Personal communication
PFA	Paraformaldéhyde
pH	Potentiel hydrogène
PI	Post-injection (ou post-ingestion dans la Partie 4)
PO	Phénoloxydase
qPCR	PCR quantitative
qsp	Quantité suffisante pour
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNC	Système Nerveux Central
TA ₅₀	Time Activity 50%
TAE	Tris Acétate EDTA
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGGE	Thermal Gradient Gel Electrophoresis
THC	Taux d'hémocytes circulants
TL ₅₀	Time Lethal 50%
T _m	Température de fusion moléculaire
TS ₁₀₀	Time surface 100%
<i>wsp</i>	<i>Wolbachia</i> Surface Protein
μL	Microlitre
μm	Micromètre
μM	Micromolaire

Première partie

Introduction générale : Virulence de *Wolbachia* et transferts horizontaux

1 Les interactions symbiotiques

1.1 Généralités sur la symbiose

Le terme de symbiose (du grec « vivre ensemble ») qualifie toute interaction durable associant au moins deux organismes distincts pendant la majeure partie de leur cycle de vie (DeBarry 1879). Il n'existe probablement sur la planète aucun organisme qui ne vive pas associé avec un autre organisme (Combes 1995 ; Douglas 2010 ; Renaud *et al.* 2007). L'exemple majeur illustrant ce fait n'est autre que la cellule eucaryote qui est elle-même le produit de la symbiose de procaryotes ayant donné entre autres les mitochondries et les chloroplastes (Margulis 1993). L'ubiquité de ce type d'interaction montre à quel point les symbioses, qui se caractérisent par des interactions durables entre un hôte (le plus gros) et un symbiote (le plus petit), peuvent constituer un moteur de l'évolution (Maynard-Smith 1989).

Il existe une très grande diversité parmi les interactions symbiotiques, réparties le long d'un continuum incluant (i) les associations mutualistes où hôtes et symbiotes voient leurs valeurs sélectives (ou *fitness*) augmenter (Combes 1995), (ii) le commensalisme, où les deux partenaires coexistent sans qu'il y ait ni coût ni avantage pour l'hôte (Cheng 1991) et (iii) enfin le parasitisme où seuls les intérêts du symbiote sont satisfaits au détriment de ceux de son hôte (Combes 1995). Pour qu'il y ait symbiose, il faut qu'une intimité plus ou moins forte s'établisse entre les partenaires. Ce degré d'association physique peut se replacer sur un continuum allant de l'ectosymbiose (où le symbiote vit sur l'hôte) à l'endosymbiose (où le symbiote vit dans l'hôte). Le cas de l'endocytobiose, où le symbiote vit à l'intérieur des cellules de son hôte correspond à l'intimité la plus extrême existant entre deux êtres (Combes 1995). Un système symbiotique est un ensemble dynamique, en ce sens que toute interaction peut évoluer dans le temps le long de ces deux continuums selon les intérêts des différents partenaires ainsi qu'en fonction de la pression induite par les composantes de leur environnement (Fellous & Salvaudon 2009 ; Leigh 2010 ;

Thrall *et al.* 2007). Pour que cette relation soit durable, des systèmes de régulation chez les deux partenaires ont été sélectionnés. Dans le cas d'une symbiose dite mutualiste, la sélection peut mener l'hôte à maintenir son symbiote et le préserver de ses défenses immunitaires tandis que le symbiote peut être amené à fortement modérer sa virulence afin de ne pas réduire la valeur adaptative de son hôte. En revanche, dans le cas d'une symbiose parasitaire, l'hôte va tenter d'éliminer le symbiote tandis que celui-ci met en place des stratégies visant à contourner sans cesse les moyens mis en œuvre par l'hôte pour contrôler sa prolifération (Combes 1995). La symbiose constitue ainsi une force évolutive majeure entraînant de nombreuses adaptations chez les deux partenaires mis en jeu. Dans le cas d'associations mutualistes ou parasitaires, la pérennité de la symbiose dépend des pressions de sélection qui s'exercent réciproquement sur les partenaires de cette étroite association (et leur phénotype étendu), constituant ainsi un des moteurs de la co-évolution. Ces interactions entraînent par exemple la sélection de mécanismes de défense chez l'hôte ou de facteurs de virulence chez le symbiote. Cette course aux armements [ou théorie de la Reine Rouge, (van Valen 1973)] entre un symbiote et son hôte conduit à des adaptations au niveau génomique qui peuvent mener à des modifications d'expression de gènes de chacun des deux partenaires et aller jusqu'à des modifications structurelles importantes de leurs génomes (réduction de taille, élimination de gènes redondants, etc.) (Combes 1995 ; Dale & Moran 2006 ; Fellous & Salvaudon 2009). Par ailleurs, du fait de l'intimité des organismes au sein d'une interaction symbiotique, le génotype du symbiote agit à la fois sur son propre phénotype mais également sur celui de son hôte et réciproquement, ce que Dawkins (1982) a nommé le « phénotype étendu ». Ainsi, l'hôte accompagné de ses symbiotes représente bien l'unité sur laquelle s'exerce la sélection naturelle.

1.2 La transmission, élément clef de l'évolution de la symbiose

L'interaction symbiotique ne peut être durable à l'échelle évolutive que s'il y a transmission du symbiote d'hôtes en hôtes (Ewald 1987). Pour se transmettre, les symbiotes empruntent deux grandes voies : la voie horizontale où le symbiote est acquis par l'intermédiaire de l'environnement et la voie verticale où le symbiote est transmis à la descendance par la mère ou dans des cas plus rares, par les deux parents (Bright & Bulgheresi 2010). La symbiose, processus dynamique en terme de coûts et bénéfices, l'est également en terme de transmission qui n'est pas restreinte à une seule et unique modalité. Ainsi, certains symbiotes peuvent se transmettre à la fois de manière verticale et horizontale, via l'environnement ou contact infectieux entre organismes appartenant ou non à la même espèce (Bright & Bulgheresi 2010).

1.2.1 La Transmission horizontale

Lorsque le symbiote est exclusivement transmis par la voie horizontale, on observe dans le cycle de vie des hôtes une phase asymbiotique (du moins pour le symbiote concerné) souvent au moment de la naissance de ces derniers et une phase symbiotique après rencontre des hôtes avec les populations de symbiotes (Bright & Bulgheresi 2010). Ce type de transmission engendre beaucoup de brassage entre hôte et symbiote et, de ce fait, très peu de congruence entre leurs phylogénies respectives (Sachs *et al.* 2011). Pour que la symbiose puisse s'établir, il faut que les partenaires se rencontrent (qu'ils passent le filtre de rencontre) et qu'ils puissent vivre ensemble [qu'ils ouvrent le filtre de compatibilité ou filtre physiologique ; (Combes 1995)] à chaque génération : il s'agit là de processus adaptatifs. Par exemple, la symbiose établie entre la seiche *Euprymna scolopes* et la bactérie *Vibrio fischeri* illustre parfaitement la difficulté de cette rencontre et les adaptations qui sont nécessaires à sa réalisation : les juvéniles naissent asymbiotiques et doivent acquérir leur symbiote *V. fischeri* via leur environnement. Les *V. fischeri* vont alors coloniser un organe spé-

cifique (l'organe luminescent) et produire une enzyme, la luciférase, permettant aux seiches d'émettre une bioluminescence à des fins de camouflage. En effet, le processus de «contre-illumination» permis par l'organe luminescent empêche la formation de l'ombre de la seiche sur le fond marin et la rend ainsi invisible à ses prédateurs (Nyholm & McFall-Ngai 2004). Les *Vibrio* sont présents dans l'eau de mer et les souches nécessaires à la symbiose sont reconnues et sélectionnées par l'intermédiaire, entre autre, du mucus produit par l'hôte. Cette attraction/sélection de symbiotes via des composés chimiques produits par l'hôte se retrouve également chez l'association entre *Candidatus endoriftia persephone* et des vers tubicoles. Ces derniers vont synthétiser de nombreuses protéines impliquées dans la formation de récepteurs chimiques et dédiés à la capture des symbiotes (Robidart *et al.* 2008). Attirer son symbiote par l'intermédiaire de molécules chimiques n'est pas l'apanage du règne animal puisque chez les plantes légumineuses vivant en symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobia*, l'attraction s'effectue également via divers composés chimiques tels que les flavonoïdes sécrétés par les racines de la plante hôte (Gage 2004).

1.2.2 La Transmission verticale

Contrairement aux symbioses à transmission horizontale où l'hôte présente une phase asymbiotique dans son cycle de vie, les symbioses à transmission verticale se caractérisent par le côté permanent de l'association hôte/symbiote. De ce fait, tous les stades hôtes sont infectés dès la formation de la cellule-œuf puisque les symbiotes sont contenus et transmis par le cytoplasme de l'ovocyte. On peut également rencontrer des cas où les symbiotes sont répartis entre les organes reproducteurs (lignée germinale pour se transmettre) et un organe spécialisé, le bactériome (lignée somatique où ces symbiotes aident à la nutrition de l'hôte). Ce cas est observé chez le coléoptère *Sitophilus oryzae* dont la population de symbiotes primaires SPE (*Sitophilus oryzae* Primary Endosymbiont) originelle va se scinder en deux populations distinctes : l'une infectant le bactériome, organe qui disparaîtra chez les individus adultes, et

l'autre infectant les ovaires tout au long de la vie des femelles (Nardon 1971). Un cas relativement similaire est rencontré chez le pou du cheveu *Pediculus humanus* vivant en symbiose obligatoire avec la bactérie intracellulaire *Candidatus rieszia pediculicola*. Au cours du développement des femelles *P. humanus*, les symbiotes vont quitter le bactériome pour gagner les oviductes (Perotti *et al.* 2007). Si la transmission verticale s'effectue principalement par voie transovarienne, certains symbiotes maternellement hérités le sont *in utero* via les sécrétions des glandes lactiques comme cela est le cas pour l'endosymbiote *Wigglesworthia glossinidia*, symbiote nutritionnel obligatoire de la mouche Tsé-tsé (Aksoy 1995 ; Pais *et al.* 2008).

Bien plus rarement, les spermatozoïdes peuvent jouer un rôle dans la transmission verticale (en plus des ovocytes) comme chez le puceron *Acyrnosiphon pisum* qui transmet ses symbiotes secondaires facultatifs *Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica* et *Regiella insecticola* à sa descendance de manière biparentale (Bright & Bulgheresi 2010 ; Moran & Degnan 2006). Un cas similaire est rencontré chez *Steinernema*, nématodes entomopathogènes dont les entérobactéries du genre *Xenorhabdus* sont transmises par les deux parents (Sicard *et al.* 2003).

Dans les cas de la transmission verticale stricte, les phylogénies entre hôtes et symbiotes sont le plus souvent congruentes du fait de l'étroite co-évolution entre les partenaires. Par ailleurs, on observe très fréquemment pour ces symbiotes une réduction importante de la taille de leur génome qui peut s'expliquer par la perte de nombreux gènes devenus « superflus » dans l'environnement riche et protégé de la cellule ou de l'organisme hôte (Dale & Moran 2006 ; Moran *et al.* 2008).

1.2.3 Lorsque transmission verticale et horizontale coexistent...

La transmission verticale est rarement l'unique voie employée par un symbiote pour se transmettre aux générations suivantes d'hôtes, en particulier lorsqu'il s'agit de symbiotes secondaires. D'une manière générale, si les symbiotes sont principalement hérités des parents (dans la plupart des cas, de la mère), des transferts horizon-

taux intra- ou inter-spécifiques surviennent fréquemment. Ces cas ont été suggérés par les résultats d'études phylogénétiques qui mettent en évidence un manque de congruence entre les phylogénies hôtes et symbiotes. Chez les ascidies, si les œufs sont le plus généralement porteurs du symbiote *Prochloron spp.*, il arrive parfois que ce soit les larves qui soient infectées par ces mêmes symbiotes, prélevés dans le milieu extérieur via la cavité cloacale de l'hôte (Hirose & Fukuda 2006 ; Münchhoff *et al.* 2007). D'autres cas de transferts horizontaux de symbiotes habituellement hérités verticalement sont retrouvés chez des oligochètes marins (Blazejak *et al.* 2006), chez plusieurs espèces de Bryozoaires *Bugula spp.* et leurs symbiotes *Candidatus endobugula spp.* (Lim-Fong *et al.* 2008) ainsi que chez diverses espèces de mollusques bivalves appartenant à la famille des Solemyidae et leurs γ -protéobactéries symbiotiques (Krueger *et al.* 1996).

Chez les insectes et les crustacés isopodes terrestres, ce sont les α -protéobactéries endosymbiotiques *Wolbachia pipientis* qui mettent le mieux en lumière l'occurrence de ces transferts horizontaux occasionnels (Zug *et al.* 2012). Ainsi, Heath *et al.* (1999) a démontré que la souche de *Wolbachia* naturellement présente chez *Drosophila simulans* a été retrouvée chez la guêpe parasitoïde *Leptopinila boulandi*, parasite de cette espèce de drosophile. Des transferts intra-spécifiques de *Wolbachia* ont été mis en évidence au sein des guêpes parasitoïdes *Nasonia vitripennis* (Werren *et al.* 1986) et *Trichogramma kaykai* (Huigens *et al.* 2000). Chez les crustacés isopodes terrestres, les souches de *Wolbachia* possèdent également la capacité de se transmettre horizontalement de manière naturelle par l'intermédiaire d'un contact entre individus blessés via les cellules hémocytaires (Rigaud & Juchault 1995).

1.3 Les compromis transmission/virulence

Dans les systèmes hôte-symbiote, le mode de transmission du symbiote est intimement lié à l'évolution de la virulence [Pour revue, voir Ebert & Herre (1996), Lipsitch *et al.* (1996)]. Le lien entre transmission et virulence peut être résumé

comme suit : « Si le symbiote est trop virulent, la maladie qu'il va provoquer chez l'hôte va induire des perturbations de sa transmission et le symbiote va évoluer vers une forme bénigne. En revanche, lorsque la maladie induite par la présence du symbiote n'empêche pas sa transmission, alors les symbiotes qui se reproduisent le plus rapidement, donc les plus virulents, se retrouvent avantagés » (Ewald 1993).

Dans les cas de la transmission horizontale, il est clair que le lien entre les valeurs sélectives des symbiotes et leurs hôtes est moins direct que dans le cas des symbioses transmises verticalement. Il y a alors potentiellement émergence de conflits d'intérêts entre les deux partenaires qui peuvent mener à une escalade dans la virulence du symbiote. Cependant, cette escalade dans la virulence est contrainte différemment selon que le symbiote est transmis par vecteur ou par simples contacts (Combes 1995). Ainsi, lorsque la propagation du symbiote se fonde sur la mobilité de son hôte, comme c'est le cas des rhinovirus, agents causals du rhume, une virulence modérée est favorisée par la sélection (Alizon 2008). À l'opposé, lorsque la transmission se fait via un vecteur (par exemple un insecte), le symbiote (par exemple le protozoaire *Plasmodium*) va se multiplier abondamment dans l'hôte vertébré car sa probabilité de transmission sera positivement corrélée à sa multiplication, même s'il en résulte une forte virulence (Ewald 1993 ; Myer & Rothman 1995).

2 Les *Wolbachia*, symbiotes ubiquistes des arthropodes

2.1 Les *Wolbachia*

La bactérie *Wolbachia pipientis* (Hertig 1936) (nommée simplement *Wolbachia* par la suite) est un endocytobiotte obligatoire appartenant à la classe des α -protéobactéries. Découvertes pour la première fois au sein des ovocytes du moustique *Culex pipiens* à qui elles doivent leur nom d'espèce (Hertig & Wolbach 1924), elles possè-

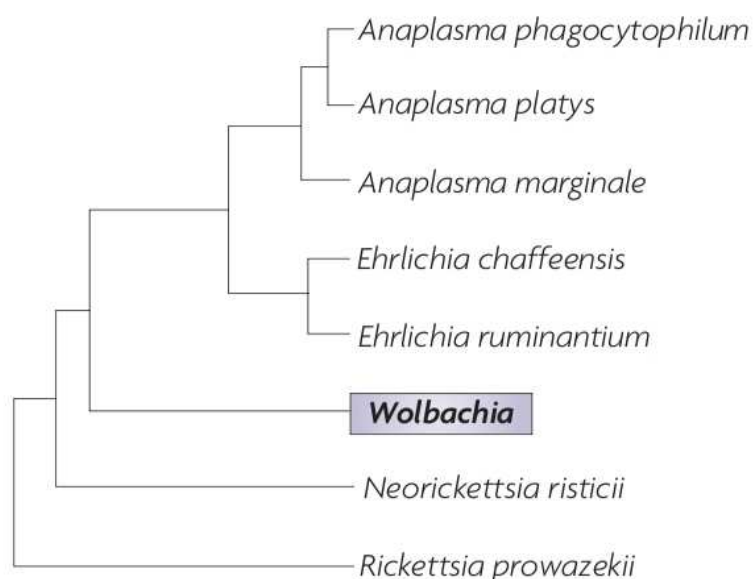


FIGURE I-1 – Position phylogénétique de *Wolbachia* par rapport à l'ordre des Rickettsiales faisant partie de la famille des Anaplasmataceae (Werren *et al.* 2008)

dent un très large spectre d'hôtes. Les *Wolbachia* se retrouvent chez des nématodes filaires (Bandi *et al.* 1998) et dans de nombreuses classes d'Arthropodes [Arachnides (Breeuwer & Jacobs 1996 ; Tsagkarakou *et al.* 1996), Crustacés (Bouchon *et al.* 1998 ; Cordaux *et al.* 2012) et Insectes (revues dans Werren (1997)]. En tant qu'endosymbiote strict, ces bactéries à coloration de Gram négatif sont localisées dans le cytoplasme des cellules de leur hôte, généralement dans une vacuole protectrice (Martin *et al.* 1973 ; Siozios *et al.* 2008) et ne peuvent être cultivées *in vitro*.

Les phylogénies moléculaires ont montré que les α -protéobactéries *Wolbachia* font partie d'un groupe monophylétique dans la famille des Rickettsies (Williams *et al.* 2007). Leurs plus proches parents sont des bactéries intracellulaires des genres *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* et *Neorickettsia* (Breeuwer *et al.* 1992 ; O'Neill *et al.* 1992 ; Rousset *et al.* 1992) dont certaines sont bien connues comme étant les agents de pathologies humaines comme le typhus (Hackstadt 1996) ou la « fièvre des montagnes rocheuses » (Thorner *et al.* 1998) (Figure I-1). Les phylogénies réalisées avec différents marqueurs (gènes 16S ADNr, *ftsZ*, *wsp* etc.) ont permis de

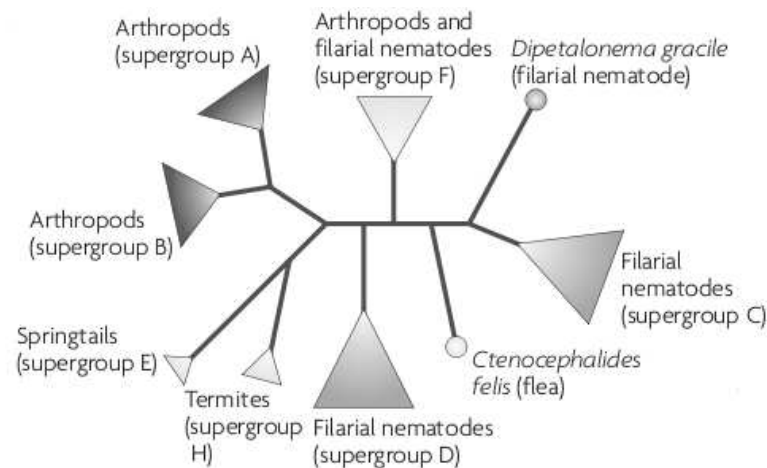


FIGURE I-2 – Les différents supergroupes des *Wolbachia*. Les *Wolbachia* sont réparties en 8 supergroupes nommés de A à H (Werren *et al.* 2008).

regrouper les différentes souches de *Wolbachia* en 8 clades nommés supergroupes A à H (Casiraghi *et al.* 2005 ; Lo *et al.* 2007, 2002) (Figure I-2). Les supergroupes A et B semblent spécifiques des arthropodes (Werren *et al.* 1995) tandis que les clades C et D apparaissent comme spécifiques des nématodes (Bandi *et al.* 1998). Le supergroupe E a été décrit comme regroupant les *Wolbachia* infectant les Collembolles (Czarnetzki & Tebbe 2004). Au sein du clade F se retrouvent mêlées des souches de *Wolbachia* d'arthropodes et de nématodes du genre *Mansonella* (Baldo *et al.* 2007 ; Covacin & Barker 2007). Le supergroupe G regroupe des *Wolbachia* infectant des araignées australiennes (Rowley *et al.* 2004) tandis que les souches présentes chez les termites sont classées dans le clade H (Bordenstein & Rosengaus 2005). À l'heure actuelle, toutes les souches de *Wolbachia* identifiées chez les crustacés isopodes terrestres appartiennent au supergroupe B (Bouchon *et al.* 1998 ; Cordaux *et al.* 2004, 2012). Les *Wolbachia* se transmettent essentiellement par la voie verticale, de la mère à sa progéniture via le cytoplasme de l'ovocyte. Néanmoins, le manque de congruence entre les phylogénies hôtes et symbiotes suggère l'existence de transferts horizontaux plus ou moins fréquents (Cordaux *et al.* 2001 ; Vavre *et al.* 1999 ; Werren *et al.* 2008).

2.2 *Wolbachia*, un endosymbiote manipulateur...

Du fait de la transmission verticale exclusivement par la mère, les mâles constituent une impasse évolutive pour *Wolbachia*. Quatre principales stratégies de manipulation de la reproduction (i.e., phénotype étendu) ont été sélectionnées conduisant à augmenter la proportion de femelles infectées et ainsi favoriser la dispersion des *Wolbachia* au sein des populations (Stouthamer *et al.* 1999 ; Werren *et al.* 2008).

2.2.1 L'incompatibilité cytoplasmique (IC)

L'incompatibilité cytoplasmique ou incompatibilité de croisement est un isolement reproducteur post-zygotique. Ce phénotype étendu est le plus répandu, ce qui suggère qu'il pourrait être l'effet ancestral à partir duquel les autres phénotypes auraient pu évoluer (Rigaud & Rousset 1996). En effet, ce phénotype a été décrit chez de nombreux insectes (Hoffmann & Turelli 1997), chez des acariens (Gotoh *et al.* 2007) et plusieurs espèces d'isopodes terrestres (Legrand & Juchault 1986 ; Moret *et al.* 2001). Dans le cas d'une incompatibilité uni-directionnelle, le croisement entre un mâle infecté et une femelle non infectée par *Wolbachia* ne sera pas viable. La valeur sélective des femelles non infectées est ainsi réduite tandis que celle des femelles infectées augmente puisque ces dernières pourront se reproduire quel que soit le statut d'infection du mâle (Serbus *et al.* 2008 ; Werren 1997). Cet isolement reproducteur post-zygotique est dû à une condensation anormale des chromosomes paternels qui ne peuvent alors pas participer à la caryogamie (Callaini *et al.* 1997 ; Dobson & Tanouye 1996 ; Kose & Karr 1995). Dans le cas d'incompatibilité cytoplasmique bi-directionnelle, les partenaires doivent être infectés par la même souche pour que les croisements soient compatibles. Ceci donne un avantage sélectif aux femelles qui hébergent plusieurs lignées bactériennes, favorisant les cas de multi-infection (Mouton *et al.* 2004).

2.2.2 La pathenogenèse thélytoque

La parthénogenèse thélytoque a été démontrée chez les hyménoptères haplo-diploïdes notamment chez *Muscidifurax uniraptor* (Gottlieb *et al.* 2002), *Diplolepis spinosissimae* (Plantard *et al.* 1998), chez les Trichogrammes (Vavre *et al.* 2004), mais aussi chez deux espèces d'acariens (Weeks & Breeuwer 2001). Chez ces organismes à hérédité haplo-diploïde, en l'absence de *Wolbachia*, seuls les œufs fécondés vont donner naissance à des femelles, les œufs non fécondés se développant en embryons mâles. Lorsque la femelle est infectée, *Wolbachia* entraîne une diploïdisation du matériel génétique des œufs conduisant au développement systématique de l'embryon en femelle, ce qui aboutit à la disparition des mâles dans la descendance des mères infectées (Huigens *et al.* 2000).

2.2.3 La mort des mâles

La mort des mâles (ou « *male killing* ») se traduit, en présence de *Wolbachia*, par la mort des embryons mâles au cours de leur développement, via la destruction de leurs chromosomes (Jaenike 2007a). Ce phénomène, qui peut aussi être causé chez les insectes par d'autres types de bactéries (notamment des Rickettsies) mais aussi par des microsporidies (Hurst *et al.* 1997), concerne des coléoptères (Fialho & Stevens 2000 ; Hurst *et al.* 1999), des lépidoptères (Jiggins *et al.* 2000) et des diptères (Hurst *et al.* 2000). En cas de compétition entre les larves pour les ressources, l'élimination de la fraction mâle de la portée va favoriser les femelles infectées de la descendance. Ces dernières n'ont plus à partager les ressources limitantes du milieu et, de plus, vont se nourrir des mâles morts. Ceci engendre une augmentation de la valeur sélective de ces femelles comparée à celle de femelles non-infectées (Hurst *et al.* 2000).

2.2.4 La féminisation

La féminisation qui entraîne la transformation des mâles génétiques en néofemelles fonctionnelles a été initialement découverte chez les crustacés isopodes terrestres (Bouchon *et al.* 1998 ; Martin *et al.* 1973) mais a depuis été récemment décrite chez une espèce de Cicadelle *Zyginidia pullula* (Negri *et al.* 2006) et chez le lépidoptère *Eurema hecabe* (Narita *et al.* 2007). Chez les crustacés terrestres, bien que les mécanismes exacts de la féminisation ne soient pas encore connus, il semblerait que *Wolbachia* puisse bloquer le développement et le fonctionnement de la glande androgène, lieu de synthèse de l'hormone androgène et clef du déterminisme du sexe mâle (Bouchon *et al.* 2008 ; Cordaux *et al.* 2011 ; Rigaud 1997). Par ailleurs, la présence d'un sex-ratio biaisé en faveur des femelles au sein des populations d'*Armadillidium vulgare* (crustacé isopode terrestre) n'hébergeant pas *Wolbachia* a permis de mettre en évidence un autre facteur féminisant *f*. Ce facteur *f* pourrait être né d'une insertion d'une portion de génome de *Wolbachia* dans celui de son hôte, en faisant alors un facteur féminisant nucléaire (Cordaux *et al.* 2011 ; Juchault & Mocquard 1993).

2.3 De la transmission maternelle au transfert horizontal

Bien que la transmission verticale soit la voie majeure de dispersion des *Wolbachia*, ces endosymbiotes peuvent également se répandre dans les populations d'arthropodes par contact infectieux (transmission horizontale) comme le démontre de nombreuses études phylogénétiques sur des modèles variés (Bouchon *et al.* 2008 ; Timmermans *et al.* 2004 ; Vavre *et al.* 1999 ; Viljakainen *et al.* 2008 ; Watanabe *et al.* 2012 ; Werren *et al.* 2008). Cependant, les voies écologiques et les mécanismes permettant ces transferts sont loin d'être tous élucidés.

Pour qu'un transfert horizontal puisse se produire, il faut dans un premier temps que les partenaires (hôtes et symbiotes) se rencontrent, c'est-à-dire que le filtre de rencontre soit ouvert (Combes 1995). De ce fait, les transferts horizontaux de *Wol-*

bachia apparaissent plus probables lorsque les hôtes respectifs présentent des liens écologiques étroits [Grégarisme (Warburg *et al.* 1984), relation hôte/parasite, relation prédateur/proie (Cordaux *et al.* 2001)], en particulier lors de transmissions à l'échelle inter-spécifique. Deux cas de transferts horizontaux inter-spécifiques naturels (sans injection du symbiote) ont été décrits dans la littérature. Le premier concerne l'insecte hôte *D. simulans* infecté par la souche *w*Ri induisant de l'incompatibilité cytoplasmique et son parasitoïde *L. boulardi*, naturellement non infecté par *Wolbachia* (Heath *et al.* 1999). Le transfert a eu lieu en élevant le parasitoïde non infecté sur une souche infectée de *D. simulans*. Toutefois, l'infection a été perdue en quelques générations chez *L. boulardi*. Le second cas concerne également des guêpes parasitoïdes, du genre *Trichogramma* infectées par différentes souches de *Wolbachia* induisant une parthénogenèse thélytoque chez lesquelles Huigens *et al.* (2000) ont pu mettre en évidence des transferts horizontaux à l'échelle intra comme inter-spécifique (Huigens *et al.* 2004). Cependant, l'infection tend également à disparaître au fil des générations d'hôtes.

À l'échelle intra-spécifique, les travaux menés par Rigaud *et al.* (1995) sur l'isopode terrestre *A. vulgare* ont démontré que des transferts de *Wolbachia* pouvaient s'effectuer par contact sanguin entre deux individus blessés, les symbiotes étant véhiculés par l'hémolymphe contenant notamment des cellules immunitaires (hémocytes) infectées (Chevalier *et al.* 2011 ; Rigaud *et al.* 1991). Le succès expérimental de ce type de transmission inter-individuelle est très élevée. De plus, comme ces cloportes ont un comportement grégaire et que le taux d'individus naturellement blessés a été estimé à 10 %, ce mécanisme pourrait être une voie fréquente de transmission horizontale (Rigaud & Juchault 1995). Ceci permettrait ainsi d'expliquer l'éloignement phylogénétique existant entre les trois souches de *Wolbachia* hébergées par *A. vulgare*. En effet, les souches *w*VulC et *w*VulM ne seraient pas issues de la divergence d'une même souche ancestrale mais auraient été acquises indépendamment tandis que la souche *w*VulP serait le produit de leur recombinaison (Bouchon *et al.* 1998 ;

Cordaux *et al.* 2004, 2012 ; Verne *et al.* 2007).

Si les parasitoïdes et les contacts sanguins entre animaux blessés apparaissent comme des voies de transmission horizontale probables, les relations trophiques (prédateurs / proies) pourraient également contribuer au passage des *Wolbachia* entre les arthropodes. Cependant, les différentes études phylogénétiques (Yun *et al.* 2011) et quelques études expérimentales (Cordaux *et al.* 2001 ; Enigl *et al.* 2005 ; Hurst *et al.* 2012 ; Juchault *et al.* 1974) n'ont pas permis de démontrer de liens tangibles entre la consommation de proies infectées par *Wolbachia* et la présence de ces mêmes souches chez les prédateurs. Néanmoins, cette voie de transmission pourrait bel et bien exister puisqu'elle est démontrée chez d'autres arthropodes comme les termites pour l'acquisition de leurs symbiotes digestifs (Khan 1981).

De nombreux transferts horizontaux expérimentaux de *Wolbachia* ont été effectués, la plupart du temps avec succès suite à l'injection de l'endosymbiote au sein des nouveaux hôtes (au stade œuf, larve ou adulte) ou par infection de lignées cellulaires (McMeniman *et al.* 2008). Cependant, l'établissement de ces nouvelles symbioses est souvent transitoire, avec soit une absence de transmission verticale des souches nouvellement acquises, soit une perte plus ou moins rapide de l'infection au fil des générations. Les phénotypes étendus induits par *Wolbachia* chez les hôtes natifs sont également rarement conservés chez les nouveaux hôtes, en particulier lorsqu'il s'agit de souches féminisantes et que le nouvel hôte est phylogénétiquement distant de l'hôte natif (Rigaud *et al.* 2001). Ainsi, Kageyama *et al.* (2008) ont montré que, malgré l'installation avérée de la souche féminisante de *Wolbachia* du lepidoptère *Eurema hecabe* dans des larves de *Bombyx mori*, aucune descendance infectée n'était observée. Dans quelques cas, la transfection du nouvel hôte est suivie d'un ou de plusieurs transferts verticaux de la souche de *Wolbachia*. Ceci est rencontré pour l'une des deux souches provenant de *Rhagoletis cerasi* (Diptère) qui s'implante chez *D. simulans* mais ne se transmet à la descendance qu'à de faibles taux (Riegler *et al.* 2004). Des résultats similaires sont retrouvés après injection de la souche présente

chez l'hyménoptère *Muscidifurax uniraptor* (souche provoquant une parthénogenèse chez l'hôte natif) chez le même receveur, *D. simulans* (Van Meer & Stouthamer 1999) : la souche se transmet mais l'infection est rapidement perdue. Il existe néanmoins des cas où la nouvelle symbiose établie paraît pérenne, avec conservation du phénotype étendu qui se trouve être toujours, dans les cas étudiés, de l'incompatibilité cytoplasmique. Ainsi, la souche *w*Ri infectant naturellement *D. simulans* colonise et se transmet de manière adéquate chez la cicadelle *Laodelphax striatellus* [déjà porteuse de *Wolbachia*, permettant ainsi la création de lignées bi-infectées (Kang *et al.* 2003)] et chez le moustique *Aedes albopictus* où l'implantation de *w*Ri induit une incompatibilité cytoplasmique (Xi *et al.* 2006). L'injection réciproque de la souche de *Wolbachia* d' *Ae. albopictus* (*w*AlB) chez les embryons de *D. simulans* est également viable et une incompatibilité cytoplasmique bidirectionnelle est décelée chez les adultes (Braig *et al.* 1994). La souche *w*AlB cause également une incompatibilité de croisement lorsqu'elle est inoculée au moustique *Aedes aegypti* (Bian *et al.* 2010 ; Xi *et al.* 2005). Dans ces quelques cas, la symbiose semble se maintenir durablement via une transmission verticale stable, malgré la distance phylogénétique entre hôte natif et hôte receveur. La réussite de ces transferts, d'abord sur le plan horizontal puis sur le plan vertical permet d'envisager la création de nouvelles lignées infectées par *Wolbachia*. Cette aptitude aux transferts horizontaux peut être détournée à des fins d'utilisation des *Wolbachia* dans le contrôle des populations naturelles de vecteurs ou de ravageurs via l'incompatibilité cytoplasmique uni ou bi-directionnelle (Dobson *et al.* 2002 ; Fu *et al.* 2010 ; Laven 1967).

3 Le coût de l'infection par *Wolbachia*

Wolbachia, au-delà d'être un « parasite du sexe », peut établir des relations diverses avec ses hôtes en termes de coûts et de bénéfices, naviguant alors sur le continuum parasitisme - mutualisme (Dedene *et al.* 2001 ; Dobson *et al.* 2002).

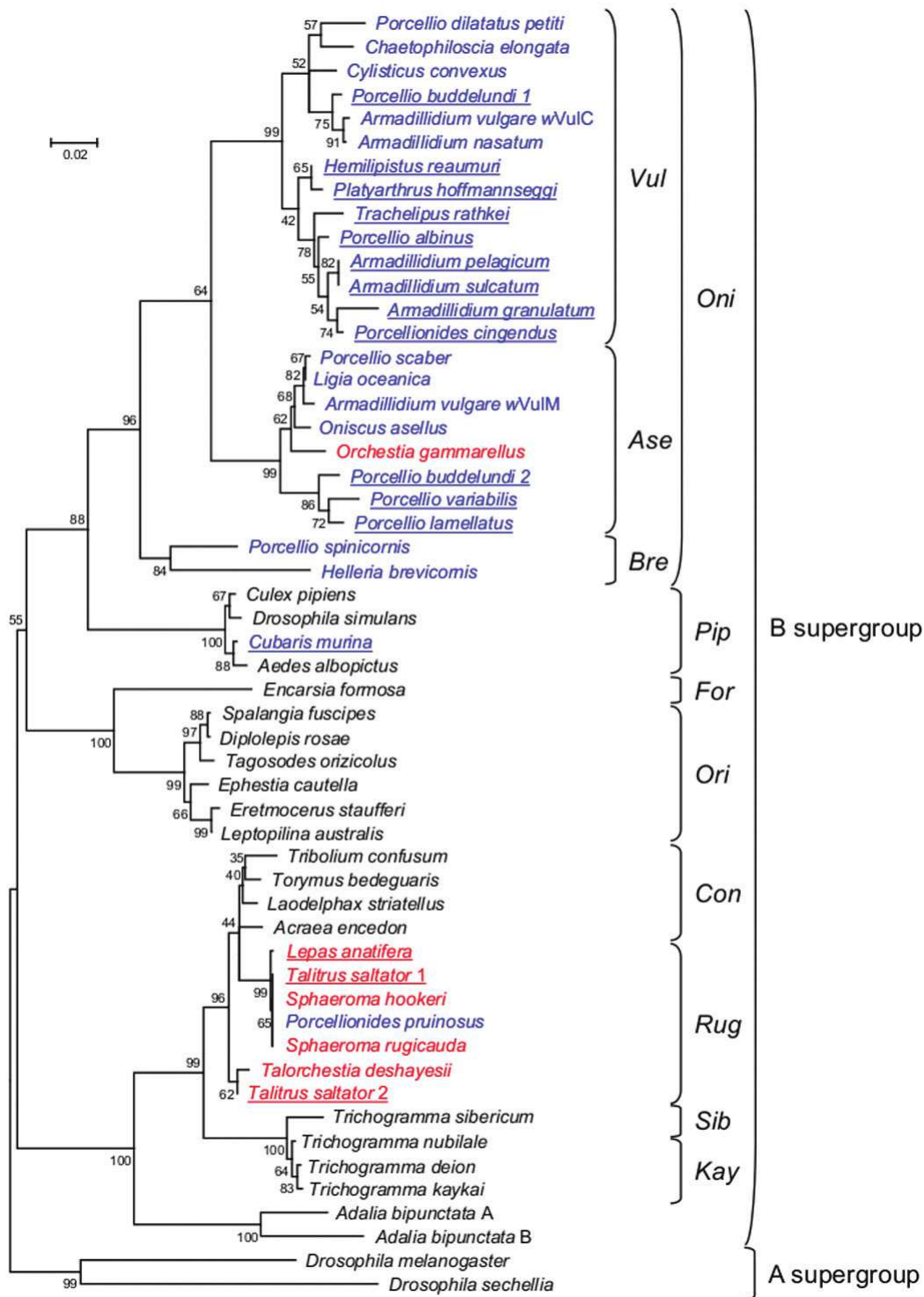


FIGURE I-3 – Phylogénies des souches de *Wolbachia* appartenant au supergroupe B, basé sur les séquences du gène *wsp*, obtenue à partir d’une analyse du Minimum d’évolution. L’ancrage de l’arbre est effectué à l’aide de deux souches de *Wolbachia* appartenant au supergroupe A et la robustesse des nœuds, exprimée en pourcentage. Les souches de *Wolbachia* sont identifiées par le nom de l’espèce hôte. Les souches d’isopodes terrestres sont représentées en bleu tandis que les souches infectant des insectes sont représentées en noir. (Cordaux *et al.* 2012)

Ainsi, différents phénotypes et impacts sur la valeur sélective ont pu être observés en fonction de la nature de la relation entre ces symbiotes et leurs hôtes (Saridaki & Bourtzis 2010 ; Werren *et al.* 2008).

3.1 Un symbiote bénéfique

Bien que dans la majeure partie des cas, la présence des *Wolbachia* ne semble pas, à l'échelle individuelle, avoir d'impact net sur la survie et le nombre de descendants de leurs hôtes (Stouthamer & Kazmer 1994 ; Turelli & Hoffmann 1995), il existe des exemples où le symbiote va être bénéfique, augmentant la valeur sélective des hôtes. Ainsi, certaines souches de *Wolbachia* entraînent une augmentation de la survie ou de la fécondité chez les mouches *D. melanogaster* et *D. simulans* (Fry *et al.* 2004 ; Weeks *et al.* 2007), le moustique *Ae. albopictus* (Dobson *et al.* 2004), le Psocoptère *Liposcelis tricolor* (Dong *et al.* 2007) et les guêpes *Trichogramma bourarachae* (Girin 1997 ; Girin & Boulétreau 1995a,b) et *N. vitripennis* (Stolk & Stouthamer 1996).

Certaines *Wolbachia* sont également impliquées dans la nutrition de leurs hôtes. De ce fait, la présence de *Wolbachia* permet à certains insectes phytophages de manipuler la physiologie des plantes via la création d'îlots photosynthétiquement actifs au sein des feuilles en sénescence, assurant ainsi à ses hôtes une meilleure nutrition (Barr *et al.* 2010 ; Kaiser *et al.* 2010). Ceci est également valable pour les insectes hématophages dont l'alimentation est carencée en particulier en vitamines B (Hosokawa *et al.* 2010). Par ailleurs, les *Wolbachia* augmentent l'activité métabolique basale ainsi que les performances dans l'acquisition de la nourriture d'insectes tel que *D. simulans* (Peng *et al.* 2008). Il a également été montré que les *Wolbachia* interagissent avec le métabolisme du fer de leurs hôtes. Chez l'hyménoptère parasitoïde *Asobara tabida* (Kremer *et al.* 2009) mais également chez *D. melanogaster* (Brownlie *et al.* 2009), *Wolbachia* entraîne une réduction de la concentration intracellulaire de fer, avec pour conséquence la protection des cellules hôtes contre l'apoptose ou

contre des composés cytotoxiques tels que les réactifs oxygénés. Récemment, il a été également démontré que les *Wolbachia* infectant *D. melanogaster* pouvaient induire une résistance à l'infection par des virus à ARN, augmentant ainsi la survie de leurs hôtes (Hedges *et al.* 2008 ; Teixeira *et al.* 2008).

La présence de *Wolbachia* peut donc conférer à son hôte des avantages sur sa valeur sélective et l'on pourrait s'attendre à ce que certaines associations *Wolbachia*/arthropodes évoluent vers des symbioses mutualistes comme c'est le cas chez les nématodes filaires (Bandi *et al.* 1998). En effet, favoriser la nutrition, la fécondité, ou la survie de son hôte peut contribuer à une stratégie évolutive optimale pour la bactérie se transmettant principalement maternellement : en maximisant la valeur sélective des femelles infectées, *Wolbachia* voit son taux de transmission augmenter et se répand ainsi plus rapidement dans les populations qu'une souche non mutualiste et plus coûteuse à porter.

3.2 Des tendances parasitaires...

La présence des *Wolbachia* n'apporte cependant pas que des bénéfices à leurs hôtes et les relations *Wolbachia*/hôtes apparaissent parfois comme conflictuelles. L'exemple le plus flagrant est celui de la souche de *Wolbachia* pathogène identifiée chez *D. melanogaster*. Cette souche de *Wolbachia*, nommée *wMelPop*, entraîne par sa prolifération excessive chez l'hôte adulte la dégénérescence des tissus et une sévère réduction de son espérance de vie (McGraw *et al.* 2002 ; Min & Benzer 1997). Cependant, des coûts moins marqués mais tout de même importants, notamment des réductions de survie et de fécondité, ont été montrés chez certains hôtes (Fleury *et al.* 2000 ; Fytrou *et al.* 2006 ; Lachat 2009 ; Sicard *et al.* 2010). Les guêpes parasitoïdes *Leptopinila heterotoma* (Fleury *et al.* 2000) et *As. tabida* (Mouton *et al.* 2004) ainsi que le crustacé isopode terrestre *A. vulgare* (Braquart-Varnier *et al.* 2008) voient leur survie diminuée en raison de l'infection par *Wolbachia*. Chez *As. tabida*, le coût sur la valeur sélective de l'hôte est positivement corrélé à la densité

bactérienne globale : ce coût est donc d'autant plus fort que le nombre de souches de *Wolbachia* présentes est élevé (Mouton *et al.* 2004). Chez l'isopode terrestre *A. vulgare*, certaines souches de *Wolbachia* (notamment la souche féminisante *wVulC*) entraînent une réduction de la fécondité des femelles (Rigaud *et al.* 1992, 2001 ; Sicard *et al.* 2010). Chez les fourmis *Formica truncorum*, les colonies infectées par *Wolbachia* sont moins performantes que les autres en raison de la baisse d'activité des fourmis ouvrières due à la diminution de leur activité métabolique basale (Wenseleers *et al.* 2001). *Wolbachia* peut également réduire l'immunocompétence de ses hôtes : les *D. simulans* infectées présentent une moindre capacité d'encapsulation d'œufs de parasitoïdes pondus par la guêpe *L. hétérotoma* (Fytrou *et al.* 2006). La perturbation de certains paramètres d'immunocompétence a également été mise en évidence chez *A. vulgare* où les femelles infectées par *Wolbachia* présentent un taux d'hémocytes circulant (THC) moins important que celui de femelles non infectées du même âge (Braquart-Varnier *et al.* 2008) ainsi qu'une baisse de l'activité phénoloxydase (Sicard *et al.* 2010). De plus, la chute du THC est corrélée à une augmentation de la septicémie naturelle de l'hémolymph (Braquart-Varnier *et al.* 2008). Toutefois, la perturbation que l'on observe au niveau de ces paramètres varie selon la souche de *Wolbachia* infectant *A. vulgare* où deux souches féminisantes ont été identifiées : *wVulC* et *wVulM* (Cordaux *et al.* 2004). Ainsi, la chute du THC occasionnée par la souche *wVulC* s'avère plus importante que celle provoquée par *wVulM*, qui pour sa part n'entraîne pas de diminution de la survie (Braquart-Varnier *et al.* 2008).

L'infection par *Wolbachia* peut donc entraîner un coût plus ou moins sévère pour les hôtes, en fonction de l'histoire évolutive de chaque association et du compromis transmission/virulence qui en découle (André *et al.* 2003). Les relations symbiotiques entre les *Wolbachia* et leurs hôtes sont donc particulièrement complexes et en constante évolution dynamique sur le continuum parasitisme - mutualisme : la variation d'un seul paramètre peut suffire à modifier la balance coût / bénéfice et

c'est notamment ce qui peut être observé en cas de transfert horizontal.

3.3 De la liberté à la dépendance : qui emprisonne qui ?

A l'exception de *wMelPop* qui est une souche de *Wolbachia* très virulente, la majeure partie des interactions entre les *Wolbachia* et leurs hôtes possède des coûts faibles qui pourrait être le résultat de l'atténuation de la virulence au fur et à mesure de la co-évolution. Cette diminution progressive de la virulence peut ainsi mener au mutualisme voire à la dépendance de l'hôte vis-à-vis de *Wolbachia*. Ceci est parfaitement illustré par la souche *wAtab3* infectant l'hyménoptère parasitoïde *As. tabida*. Chez ce dernier, cette souche de *Wolbachia* est indispensable à la réalisation de l'ovogenèse (Dedeine *et al.* 2001, 2005 ; Kremer *et al.* 2010) tandis que d'autres souches, pourtant phylogénétiquement proches, s'avèrent facultatives. Ce cas met en exergue la transition d'une symbiose facultative vers une symbiose obligatoire. Des relations de dépendance entre les *Wolbachia* et leurs hôtes ont été également clairement démontrées chez les nématodes filaires de la famille des Onchocercidae (Fenn & Blaxter 2004). L'élimination de *Wolbachia* par traitement antibiotique entraîne un arrêt de la croissance, une stérilité des hôtes (Hoerauf *et al.* 1999), une inhibition de l'embryogénèse et même la mort des vers adultes (Taylor *et al.* 2005). Un autre exemple de dépendance a été mis en évidence chez la punaise de lit *Cimex lectularius* où *Wolbachia* réside dans un bactériome et apparaît nécessaire à la nutrition de son hôte (Hosokawa *et al.* 2010). L'absence du symbiote réduit la croissance et induit une stérilité des punaise mais ces conséquences négatives disparaissent lorsque des vitamines B sont ajoutées à leur nourriture : ceci confirme le rôle essentiel de *Wolbachia* dans la nutrition de l'hôte, devenant dans ce cas un symbiote primaire. Ces relations de dépendances traduisent une étroite co-évolution entre hôte et symbiote : l'un ne peut vivre sans l'autre et ce à chacun des moments de leur existence. De ce fait, la réussite des transferts horizontaux de ces symbiotes est très peu probables à l'échelle évolutive, expliquant ainsi la congruence des phylogénies entre les

nématodes et leurs *Wolbachia* (Bandi *et al.* 1998).

4 Niveau de virulence et transfert horizontal...

Si les modèles théoriques prédisent une atténuation de la virulence de symbiotes à transmission verticale, le compromis transmission/virulence est quelque peu mis à mal lorsque les souches de *Wolbachia* sont transférées horizontalement (André *et al.* 2003 ; Bonds 2006 ; Ferdy & Godelle 2005) et des changements dans la virulence du symbiote peuvent alors survenir.

De nombreux transferts horizontaux expérimentaux ont été menés sur la souche pathogène *wMelPop*. Cette dernière a été introduite chez d'autres espèces de drosophiles telle que *D. simulans*, dont elle réduit la survie ainsi que la fécondité (Suh *et al.* 2009), mais également chez plusieurs espèces de moustiques vecteurs de pathogènes humains où elle réduit la transmission de ces derniers (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2011). L'introduction de la souche *wMelPop* chez le moustique a nécessité une adaptation de cette dernière au sein de lignées cellulaires du nouvel hôte (McMeniman *et al.* 2008). Cette étape d'adaptation préalable a été nécessaire pour que l'interaction entre *wMelPop* et ses nouveaux hôtes soit stable en raison de l'éloignement phylogénétique entre organismes donneurs et receveurs. Cependant, l'association nouvellement formée entre *wMelPop* (provenant de lignées cellulaires d'*Ae. albopictus*) et le moustique *Ae. albopictus* vecteur du virus du Chikungunya, s'est avérée extrêmement conflictuelle (Suh *et al.* 2009). En présence du symbiote *wMelPop*, *Ae. albopictus* montre une très forte altération de sa fécondité ainsi qu'une réduction importante de sa survie. La souche de *Wolbachia* colonise tous les tissus (contrairement aux souches natives d'*Ae. albopictus*) et se retrouve en très forte densité dans les ovocytes causant la diminution du taux d'éclosion des oeufs (Moreira *et al.* 2009b). Inoculée au moustique *Ae. aegypti* (naturellement non infecté par *Wolbachia*) et vecteur, entre autre, du virus de la Dengue (Brownstein *et al.* 2003 ; Cook *et al.*

2008), la souche *wMelPop* induit une nette réduction de la survie de son nouvel hôte. Cette importante mortalité survient généralement après le premier repas sanguin pris par le moustique (Turley *et al.* 2009) associée à d'importantes perturbations de son activité (Kambris *et al.* 2009). De plus, les moustiques présentent des mouvements désordonnés de leur proboscis, deviennent incapables de piquer pour se nourrir (Moreira *et al.* 2009b ; Turley *et al.* 2009) et produisent moins de salive que les individus non infectés (Moreira *et al.* 2009b). Cette activité grandement modifiée est également à mettre en lien avec une augmentation du métabolisme basal des individus infectés (Evans *et al.* 2009). L'accélération de ce métabolisme provoquerait une sénescence précoce responsable des mauvaises performances des moustiques infectés. Ainsi, ces nouveaux hôtes hébergeant *Wolbachia* vieillissent et meurent beaucoup plus rapidement que des moustiques non-infectés. Cette infection par *wMelPop* induit également une très forte incompatibilité de croisement (McMeniman *et al.* 2009) ainsi qu'une mortalité élevée des œufs au cours de la période de quiescence embryonnaire (McMeniman & O'Neill 2010). De plus, la présence de *Wolbachia* est associée une stimulation de l'expression des gènes de l'immunité qui conférerait à *Ae. aegypti* une plus grande capacité de résistance aux virus de la Dengue et du Chikungunya mais aussi au protozoaire *Plasmodium* (Glaser & Meola 2010 ; Kambris *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009a).

Introduite chez le principal vecteur de *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae* (naturellement non infecté par *Wolbachia*), la souche *wMelPop* entraîne également une forte diminution de la survie du moustique, survenant principalement dans les 12 à 24 heures faisant suite à un repas de sang (Hughes *et al.* 2011). Cette importante mortalité semble être causée par une forte augmentation du taux de fer intracellulaire, précurseur des réactifs oxygénés cytotoxiques. Tout comme chez *Ae. aegypti*, l'injection de *wMelPop* chez *An. gambiae* entraîne la stimulation de certains gènes de l'immunité (Kambris *et al.* 2010) ainsi que l'inhibition du développement de *Plasmodium* (Hughes *et al.* 2011). Contrairement à ce qui est observé chez *Aedes*

spp., *wMelPop* n'infecte pas la lignée germinale d'*An. gambiae*, empêchant ainsi toute transmission verticale de la souche (Jin *et al.* 2009). Une interaction transmissible au cours des générations entre *An. gambiae* et *wMelPop* qui aurait pu être utilisée dans la lutte contre *Plasmodium*, n'est donc pas envisageable sans manipulation supplémentaire du symbiote (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2011) L'introduction de *wMelPop*, souche pathogène de *Wolbachia* lors de transmissions verticales comme lors de transferts horizontaux, pourrait permettre de lutter efficacement contre la propagation de nombreuses maladies des zones tropicales et inter-tropicales en permettant au vecteur insecte de résister à l'infection du parasite et ainsi d'en limiter grandement la transmission (Brownstein *et al.* 2003). Cette dernière étant corrélée à l'âge des moustiques femelles (les parasites ou pathogènes vectorisés ayant besoin de se multiplier dans l'organisme du vecteur avant d'en coloniser les glandes salivaires), réduire l'espérance de vie des vecteurs via l'introduction de souches de *Wolbachia* telles que *wMelPop* pourrait également conduire à une diminution de la transmission de ces pathogènes humains (Cook *et al.* 2008 ; Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2011). Cependant, pour que ces hypothèses soient viables, il faut que la souche nouvellement implantée se répande dans les populations. Or, en dépit de l'incompatibilité cytoplasmique induite par *wMelPop*, l'importante virulence de cette souche pour ses hôtes entraîne une contre-sélection des individus infectés, empêchant la souche de coloniser les populations de vecteurs sur le long terme (Turelli 2010).

Tableau I-1 – Souches de *Wolbachia* transférées horizontalement chez trois espèces d’isopodes terrestres :*Porcellio dilatatus dilatatus*, *Armadillidium vulgare* et *Armadillo officinalis*.

Souche de <i>Wolbachia</i>	Hôte natif	Provenance de l’hôte	Phénotype étendu	Date de collecte	Référence
<i>wVulC</i>	<i>Armadillidium vulgare</i>	Helsingor Danemark	Feminisation Seuls les individus de phénotype femelle sont infectés	1991	Bouchon <i>et al.</i> (1998)
<i>wVulM</i>	<i>Armadillidium vulgare</i>	Mery sur Cher (18) France	Feminisation Seuls les individus de phénotype femelle sont infectés	1999	Cordaux <i>et al.</i> (2004)
<i>wPruIII</i>	<i>Porcellionides Pruinosus</i>	Nevers (58) France	Feminisation Les deux sexes sont infectés	1996	Michel-Salzat <i>et al.</i> (2001)
<i>wAs</i>	<i>Oniscus asellus</i>	Quinçay (86) France	Feminisation Les deux sexes sont infectés	1994	Rigaud <i>et al.</i> (1999)
<i>wCon</i>	<i>Cylisticus convexus</i>	Avanton (86) France	Incompatibilité cytoplasmique IC	1993	Moret <i>et al.</i> (2001)
<i>wDil</i>	<i>Porcellio dilatatus dilatatus</i>	St Marguerite (06) France	IC	2007	Grève, <i>com. pers.</i>
<i>wPet</i>	<i>Porcellio dilatatus petiti</i>	St Honorat (06) France	IC	1996	Legrand <i>et al.</i> (1978)
<i>wHel</i>	<i>Helleria brevicornis</i>	Bastia (2B) France	Inconnu	1992	Bouchon <i>et al.</i> (1998)

5 Présentation de la problématique

Étudier la plasticité de *Wolbachia* ainsi que l'établissement de nouvelles interactions durables entre hôtes et symbiotes plus ou moins proches phylogénétiquement est un enjeu important pour comprendre l'évolution de ces symbioses. Si les transferts horizontaux de *Wolbachia* sont aujourd'hui clairement démontrés, voire même utilisés à des fins de lutte biologique, ces études concernent quasi exclusivement des insectes avec des souches de *Wolbachia* induisant de l'incompatibilité de croisement.

Les crustacés isopodes terrestres sont naturellement infectés par de nombreuses souches de *Wolbachia* dont certaines causent de l'incompatibilité cytoplasmique et d'autres la féminisation des mâles génétiques (Table I-1, Figure I-3). Par ailleurs, leur durée de vie relativement longue (3 ans) comparée à celle des insectes permet un suivi des impacts de *Wolbachia* sur l'hôte sur le long terme.

Au cours de mon travail de thèse, des souches de *Wolbachia* induisant soit de l'incompatibilité cytoplasmique soit une féminisation des mâles ont été transfectées à trois espèces d'isopodes terrestres (*Porcellio dilatatus dilatatus*, *A. vulgare* et *Armadillo officinalis*) plus ou moins distantes phylogénétiquement de leurs hôtes natifs. Ces transferts bactériens inter-spécifiques m'ont permis d'aborder les grandes questions suivantes :

- i Quelle est la plasticité des *Wolbachia* en termes d'hôtes ? Les souches inoculées (Table I-1) sont-elles capables de se multiplier dans tous les hôtes testés ?
- ii Existe-t-il des patrons de distribution bactérienne dans les tissus des hôtes natifs en fonction des souches de *Wolbachia* ? Si oui, ces patrons sont-ils conservés après transferts horizontaux ?
- iii Les transferts horizontaux peuvent-ils mener à des changements de virulence de *Wolbachia* ?
- iv Est-il possible pour *Wolbachia* de passer d'une espèce d'isopodes terrestres à

une autre à l'échelle immédiate puis de s'établir durablement chez ces espèces à l'échelle évolutive ?

Dans un second temps, toujours chez les crustacés terrestres, mes recherches se sont orientées sur les voies écologiques et les mécanismes de ces transferts horizontaux de *Wolbachia*. En effet, seulement deux voies permettant aux transferts horizontaux naturels de s'effectuer ont été mises en évidence à l'heure actuelle et, parmi les possibilités d'acquisition de bactéries chez les isopodes, la voie trophique demeure celle qui n'a jamais été démontrée. Sachant que les isopodes terrestres ont des comportements grégaires mais aussi de prédation face à d'autres espèces de cloportes, la voie trophique pourrait être un passage assurant les transferts horizontaux de *Wolbachia*.

Finalement, j'ai abordé la question de l'évolution de la virulence avec le modèle *Wolbachia/A. vulgare* par une approche d'évolution expérimentale qui nous permet de répondre à la question suivante : La virulence bactérienne augmente-t-elle lorsque l'on court-circuite totalement la voie de transmission naturelle du symbiote (la voie verticale), pour ne plus transmettre les bactéries que par la voie horizontale ?

Deuxième partie

Transfert horizontal de *Wolbachia* :

Lorsque la symbiose tourne à la
pathologie...

1 Introduction

Des changements de niveau de virulence des symbiotes vis à vis de leurs nouveaux hôtes peuvent survenir en cas de transferts horizontaux, en particulier lorsque la voie naturelle de transmission de ces symbiotes est verticale (Lipsitch *et al.* 1996). Dans de ce premier chapitre, nous avons utilisé le modèle hôte / symbiote Isopode terrestre / *Wolbachia* pour étudier ce type de situation, soit lorsqu'une *Wolbachia* induisant un faible coût (c'est à dire une faible virulence) pour son hôte natif s'avère plus virulente une fois introduite chez un nouvel hôte (qualifié de receveur).

Comme exposé dans l'introduction générale, les *Wolbachia* sont sûrement les endosymbiotes les plus répandus chez les arthropodes et ces α -protéobactéries ont pour particularité d'induire des perturbations de la reproduction chez leurs hôtes. La sélection de ces stratégies permettent aux *Wolbachia* de se répandre au sein des populations. Ces bactéries étant transmises essentiellement par la voie ovocytaire (verticale), les processus coévolutifs entre hôte et symbiote sont prédits comme entraînant la sélection de bactéries faiblement virulentes du fait de l'alignement des intérêts des deux partenaires (Bonds 2006 ; Lipsitch *et al.* 1996). Bien que la voie verticale constitue la voie de transmission majoritaire pour *Wolbachia*, l'existence de transferts horizontaux relativement fréquents à l'échelle évolutive est clairement démontrée (Kraaijeveld *et al.* 2011 ; Werren *et al.* 2008). Cette seconde voie de dispersion dans les populations hôtes constitue donc un élément fondamental pour comprendre la dynamique évolutive de ces endosymbiotes (Werren *et al.* 1995). Rencontrer un nouvel hôte, le coloniser puis se répandre dans la population va conduire à l'émergence de nouvelles contraintes au sein des interactions symbiotiques *Wolbachia*-hôtes (Combes 1995). En cas de transfert horizontal d'un symbiote, les modèles théoriques mais également des observations médicales ou vétérinaires s'accordent à prédire de potentielles augmentations de virulence (Alizon 2008 ; André *et al.* 2003 ; Lipsitch *et al.* 1996). A l'échelle immédiate, cette virulence accrue peut être, par exemple, due à une sur-multiplication du symbiote entraînant la sur-exploitation des ressources

de l'hôte receveur ou encore à une sur-expression des défenses immunitaire de l'hôte vis à vis du symbiote (Lipsitch & Moxon 1997). Face à ce dernier cas, il s'agit d'optimiser un compromis : être plus tolérant face à la présence d'un symbiote peut constituer parfois un moyen moins coûteux pour l'hôte qu'une résistance pouvant mener à une augmentation des coûts au sein de l'interaction (Schneider & Ayres 2008). Ainsi, la coévolution entre hôte et symbiote peut conduire à la sélection (i) de mécanismes visant à contrôler la multiplication du symbiote dans les tissus hôtes ou bien (ii) de processus permettant à l'hôte de mieux le tolérer. Cette tolérance de l'hôte constitue un bon moyen pour ce dernier de réduire les coûts directs (la production d'effecteurs du système immunitaire) ainsi que les coût indirects (dommages créés par les effecteurs immunitaires sur les tissus) de la réponse immunitaire. Décrypter et comprendre les changements de virulence d'une *Wolbachia* lorsqu'elle est introduite chez un receveur a été l'objectif de cette première partie de ma thèse. Pour cela, nous avons utilisé le cas de la souche *wVulC*, déjà connue pour engendrer des coûts en terme de survie et d'immunocompétence chez son hôte naturel, l'isopode terrestre *A. vulgare* (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Sicard *et al.* 2010). De plus, inoculée au receveur *Porcellio dilatatus dilatatus* (isopode terrestre) cette souche se révèle être pathogène (Bouchon *et al.* 1998 ; Juchault *et al.* 1974). La caractérisation des différents symptômes apparaissant avant la mort des *P. d. dilatatus* injectés ainsi que l'analyse de quatre grands traits d'histoire de vie (croissance pondérale, activité locomotrice, comportement d'enfouissement et survie) a été effectuée chez le receveur mais également chez l'hôte natif asymbiotique injecté avec la souche *wVulC*. L'ensemble de ces mesures phénotypiques ainsi que les quantifications de *Wolbachia* réalisées en parallèle chez *P. d. dilatatus* et *A. vulgare* nous ont permis d'effectuer une comparaison entre receveur et hôte natif dans un contexte de transmission horizontale du même symbiote et de proposer des hypothèses quant aux causes des changements de virulence.

High Virulence of *Wolbachia* after Host Switching: When Autophagy Hurts

Winka Le Clec'h¹, Christine Braquart-Varnier¹, Maryline Raimond¹, Jean-Baptiste Ferdy², Didier Bouchon¹, Mathieu Sicard^{1*}

¹ Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Université de Poitiers, Poitiers, France, ² Evolution et Diversité Biologique, UMR CNRS 5174, Université Paul Sabatier - Toulouse III, Toulouse, France

Abstract

Wolbachia are widespread endosymbionts found in a large variety of arthropods. While these bacteria are generally transmitted vertically and exhibit weak virulence in their native hosts, a growing number of studies suggests that horizontal transfers of *Wolbachia* to new host species also occur frequently in nature. In transfer situations, virulence variations can be predicted since hosts and symbionts are not adapted to each other. Here, we describe a situation where a *Wolbachia* strain (wVulC) becomes a pathogen when transfected from its native terrestrial isopod host species (*Armadillidium vulgare*) to another species (*Porcellio d. dilatatus*). Such transfer of wVulC kills all recipient animals within 75 days. Before death, animals suffer symptoms such as growth slowdown and nervous system disorders. Neither those symptoms nor mortalities were observed after injection of wVulC into its native host *A. vulgare*. Analyses of wVulC's densities in main organs including Central Nervous System (CNS) of both naturally infected *A. vulgare* and transfected *P. d. dilatatus* and *A. vulgare* individuals revealed a similar pattern of host colonization suggesting an overall similar resistance of both host species towards this bacterium. However, for only *P. d. dilatatus*, we observed drastic accumulations of autophagic vesicles and vacuoles in the nerve cells and adipocytes of the CNS from individuals infected by wVulC. The symptoms and mortalities could therefore be explained by this huge autophagic response against wVulC in *P. d. dilatatus* cells that is not triggered in *A. vulgare*. Our results show that *Wolbachia* (wVulC) can lead to a pathogenic interaction when transferred horizontally into species that are phylogenetically close to their native hosts. This change in virulence likely results from the autophagic response of the host, strongly altering its tolerance to the symbiont and turning it into a deadly pathogen.

Citation: Le Clec'h W, Braquart-Varnier C, Raimond M, Ferdy J-B, Bouchon D, et al. (2012) High Virulence of *Wolbachia* after Host Switching: When Autophagy Hurts. PLoS Pathog 8(8): e1002844. doi:10.1371/journal.ppat.1002844

Editor: Serap Aksoy, Yale School of Public Health, United States of America

Received: March 13, 2012; **Accepted:** June 22, 2012; **Published:** August 2, 2012

Copyright: © 2012 Le Clec'h et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by the CNRS, the Université de Poitiers and the Agence Nationale de la Recherche (ADaWOL ANR-09-JCJC-0109-01). WL was supported by a grant from Région Poitou-Charentes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mathieu.sicard@univ-poitiers.fr

Introduction

Wolbachia pipientis are intracellular α -proteobacteria which are extensively distributed among arthropods and filarial nematodes. These bacteria are vertically transmitted from female hosts to their offspring. The presence of *Wolbachia* induces a number of reproductive perturbations for their hosts including cytoplasmic incompatibility (CI) [1,2], male killing [3], modification of parthenogenesis [4] and feminization [5], all enhancing the vertical spread of infection in host populations. The *Wolbachia*, in their wide range of hosts, are involved in diverse interactions in terms of costs and benefits to their host that can be placed on a continuum from mutualism to parasitism [6]. However, the global picture is that *Wolbachia* are weakly virulent to their native hosts [7,8]. This low virulence can be explained by the evolutionary consequences of vertical transmission that theoretically leads to the attenuation of symbiont virulence through a co-evolutionary process with its host [9,10]. However, the general lack of congruence between *Wolbachia* and host phylogenies suggests that *Wolbachia* frequently colonize new hosts through horizontal transfer [6,11] and that this mode of spreading may be fundamental to their evolutionary dynamics [12].

Immediately after transfer into a new host species, the virulence of *Wolbachia* is expected to differ from that expressed in its native host because of a lack of host/symbiont co-adaptation, which can only occur after several host generations. Two main non-exclusive situations have been proposed to explain the emergence of a higher level of virulence when a symbiont colonizes a new host: (1) maladapted symbionts can overexploit their host, by multiplying too fast or in a "wrong" compartment (e.g. in organs other than gonads, where *Wolbachia* are typically found), (2) maladapted hosts could respond to the presence of an unknown symbiont by employing inefficient and very costly immune defences [13]. In the first situation, the virulence comes primarily from an overexploitation of host resources by the parasites, and the new host can be considered as less resistant because parasite burden is higher in some tissues of the new host than in the native one. In the second situation, the immune system normally dedicated to the defence of organisms becomes a double-edged sword, turning itself against the host. A disproportionately strong response can lead to an immunopathology that can in turn deeply harm the hosts. Therefore, being able to tolerate the multiplication of parasites to a certain extent by not activating some immune pathways can constitute a good strategy to limit virulence [14]. It is thus possible

Author Summary

Characterizing the causes of a virulence increase when a parasite jumps from one host species to another is fundamental to the understanding of disease emergence. In this context, we studied the bacterium *Wolbachia* wVulC, a natural symbiont of one terrestrial isopod species that becomes a pathogen when transfected into individuals of another species. Before death, recipient animals suffer various symptoms including nervous system disorders caused by the multiplication of wVulC. Interestingly, the quantification of wVulC loads showed similar titers in the individuals from both the recipient and native species. The difference between the two host species lies in the way they respond to the invasion of wVulC and not in their resistance *per se*: While the recipient host species exhibits an acute autophagic response leading to central nervous system cells disorganization, this phenomenon was not observed in the native host species, which seems to better tolerate the bacterium. Together, our results show that tolerance can be a better evolutionary strategy to counteract parasite damage than to activate a putative resistance pathway which, as a double-edged sword, can arm the host itself and increase the virulence of a parasite.

that through the co-evolutionary process taking place between the *Wolbachia* and their hosts, especially as prevalence is often high, hosts quickly select either a way to attempt to control *Wolbachia* proliferation or at the opposite, a way to better tolerate the presence of the symbionts. Being able to decrease invaders load would reduce their cost for the hosts while increasing tolerance would avoid both the direct (*i.e.* production of immune effectors) and indirect costs (*i.e.* the damage caused by immune effectors) of the immune response.

To address the question of the causes of drastic change in virulence of a symbiont, we studied a situation where a *Wolbachia*-host interaction becomes pathogenic when the bacteria (wVulC) are transferred from its native terrestrial isopod species host (*Armadillidium vulgare*) to another one (*Porcellio d. dilatatus*) [15,16]. In its native host *A. vulgare*, wVulC not only colonizes gonads for vertical transmission but is also found in somatic tissues [17,18]. This extensive colonization could play a role in the virulence of wVulC detected in several *A. vulgare*'s life history traits: Reduction in hemocyte load, phenoloxylase activity, reproduction and survival [19,20]. However, though wVulC is clearly involved in a conflicting interaction with *A. vulgare* having negative impacts on several of its life history traits, this virulence is weak and *Wolbachia*-infected individuals usually live for years [19]. The aim of the present study was to understand how *Wolbachia* wVulC becomes a pathogen when introduced in the new host *Porcellio d. dilatatus*. To do so, we focused our work on the analysis of the different symptoms that appear prior death of the recipient host *Porcellio d. dilatatus*. For this, several host life history traits have been measured (gain of weight, mobility, burying behaviour). In parallel, we assessed *Wolbachia* wVulC multiplication in gonads, hemocytes (*i.e.* immune cells) and CNS (*i.e.* nerve cells and neighbouring adipocytes). Moreover, we observed gonads and CNS cells by electron microscopy. We demonstrate that infection with the strain wVulC causes acute disease to *P. d. dilatatus* with symptoms of paralysis that indicate the existence of nervous system disorders. We suggest that these symptoms and the death that follows are linked to the autophagic reaction observed in the CNS cells of *P. d. dilatatus* but not in *A. vulgare* which seems thus more tolerant to its native *Wolbachia* strain it co-evolved with.

Results

Quantification of wVulC and wDil in inoculum

In order to quantify the dose of *Wolbachia* injected into recipient hosts that could vary due to the donor host species (*A. vulgare* for wVulC and *P. d. dilatatus* for wDil), we performed quantification by qPCR on the *wsp* gene. We found that the quantities of *Wolbachia* cells inoculated in recipient hosts significantly differed between treatments (*i.e.* wVulC versus wDil). This is because the natural amount of *Wolbachia* present in the ovaries of *A. vulgare*, the donor host species of wVulC (mean dose $\pm$ se = $1.66 \times 10^3 \pm 6.30 \times 10^4$ *wsp* copies/injected μ L) is ten times higher than in *Porcellio d. dilatatus*, the donor host species of wDil (mean dose $\pm$ se = $1.14 \times 10^4 \pm 3.60 \times 10^3$ *wsp* copies/injected μ L); (comparison by t-test = 2.9956 *df* = 4 *p* = 0.0401). To evaluate the influence of the injected dose in the effect observed on the recipient hosts, we tested the effect of wVulC with a very small inoculum ($3.02 \times 10^3 \pm 2.60 \times 10^3$ *wsp* copies/injected μ L) by diluting the initial inoculum a hundred times. Moreover, to take into account the differences between injected doses in a statistical framework, the effect of the factor "dose" was tested at first to absorb as much variance as possible, and then it was therefore possible to test the effect of each strain of *Wolbachia* *per se* independently from the difference in injected dose.

wsp gene sequencing from inoculum and transfected animals

To verify that only the expected *Wolbachia* strain was present (*i.e.* wDil or wVulC) in the inoculum and in transfected *A. vulgare* and *P. d. dilatatus*, we amplified and sequenced 610 bp of the *Wolbachia* surface protein gene (*wsp*) in (i) all inoculum and (ii) recipient animals at 60 days Post Injection (PI). In all the cases, the chromatograms obtained showed well resolved peaks indicating that only one matrix has been sequenced per host or inoculum. The comparison of all the obtained sequences with the reference *wsp* sequences of wDil and wVulC showed no variation. In all cases we therefore found the strain of *Wolbachia* which was expected in the given sample.

No significant effect of *Wolbachia* injection on *Armadillidium vulgare*'s life history traits

After the injections of wVulC or wDil, no significant effects were detected for *A. vulgare* females on all the different life history traits measured (gain of weight, activity and survival) (Table 1 for statistics; Figure 1). Moreover, no nervous disorders symptoms such as seizures and tremors were observed for *A. vulgare*.

Perturbation of *Porcellio d. dilatatus*'s life history traits by wVulC

Gain of weight. A global analysis showed that 60 days post-injection, most of the variance in gain of weight between samples was explained by differences among treatments (*i.e.* control, injection of wVulC and injection of wDil) but not by difference between sex or the injected dose of *Wolbachia* (Table 2). The same model ran after removing the control treatment from the dataset, demonstrates that variations in gain of weight depends on the *Wolbachia* strain (wVulC versus wDil): wVulC induced a stronger growth slowdown than wDil (respective means for gain of weight $\pm$ se = 1.1000 ± 0.08 and 1.4900 ± 0.05 after 60 days following injection; Figure 2A; Table 2). The animals injected with the 1/100 diluted wVulC inoculum suffered a similar growth slowdown compared to those injected with the pure suspension of wVulC (ANOVA, *F* = 0.1384 *df* = 1,15 *p* = 0.7150; Figure 2A).

Table 1. Statistical analyses ran on the life history traits data obtained for female *A. vulgare* injected by *wVulC*, *wDil* and control treatment.

	Factor	Global comparison (control/ <i>wVulC</i> / <i>wDil</i>)			Comparison between effect of <i>wVulC</i> / <i>wDil</i>		
		df	deviance	p	df	deviance	p
Gain of weight (lme analyse)	Dose	1	3.5268	0.0716	1	3.1814	0.0720
	Treatment	2	3.9370	0.1396	1	3.1303	0.0768
	Residuals	12	0.0210	#	8	0.0210	#
Mobility (lme analyse)	Dose	1	3.2843	0.0699	1	2.6187	0.1056
	Treatment	2	4.5969	0.1004	1	1.6130	0.2040
	Residuals	12	8.2608	#	8	8.2608	#
Survival (Cox model analyse)	Dose	1	1.1698	0.2794	1	1.1946	0.2743
	Treatment	2	5.1525	0.0760	1	3.1256	0.0712
	Residuals	12	0.0006	#	8	0.0547	#

The gain of weight and mobility were compared between treatments at 60 days post-injection with a Gaussian linear mixed-effects model with randomized block effect fitted by maximum likelihood (ML). Survival curves obtained with the different treatments were compared using a general mixed-effects Cox model with randomized block effect.

doi:10.1371/journal.ppat.1002844.t001

Mobility. A global analysis showed that 60 days post-injection, the variance in mobility between animals was due mostly to differences among treatments (*i.e.* injection of *wVulC* or *wDil* or control) and did not relate to sex or the amount of *Wolbachia* cells injected (Table 2). A strong differential effect on mobility was induced according to the injected strain (*wVulC* or *wDil*). Between 30 and 75 days, the mobility of individuals injected by *wVulC* observed during 180 s strongly dropped from 115 ± 3.55 s to 0 s while animals injected with the native strain *wDil* or the control treatment did not exhibit reduction in mobility (150 ± 2.45 s.; Figure 2B; Video S1). Moreover, starting from 45 days post-injection, *P. d. dilatatus* individuals injected with *wVulC* turned to asthenia (*i.e.* they seemed “lax”), suffering from seizures and leg tremors. These symptoms were observed after injection of both pure suspension of *wVulC* and 1/100 diluted suspension of *wVulC* (Figure 2B; Video S1).

Buried or not? Another change in the behaviour of *P. d. dilatatus* observed after *Wolbachia* injection was the location in the rearing box substrate. The normal behaviour of aposymbiotic *P. d. dilatatus* is to bury themselves into the substrate. But after *Wolbachia*'s injections, some males and females rose at the surface (Figure 2C; Video S1). The analysis of data with a binomial general linear model showed that the factor that statistically explained most of the variability in location was again the type of *Wolbachia* strain injected (Table 2). Between 45 and 60 days post-injection, most of the individuals injected with the pure or 1/100 diluted inoculum of *wVulC* strain were found at the surface (respectively 100% and 57 to 72% of the animals) while after *wDil* injection, only 6.7% of animals were spotted at the surface over the whole 75 days observation period. For the control treatment the situation was totally opposite to the one observed with *wVulC* since not a single animal was found at the surface of the substrate over the 75 days period of observation (Figure 2C; Video S1).

Survival. The above described symptoms for the *P. d. dilatatus* injected with the pure and diluted suspensions of *wVulC* (*i.e.* decrease in gain of weight, mobility and number of animals buried) were followed by death of all the animals (Figure 2D). Comparison of survival plots between groups of individuals of *P. d. dilatatus* injected with *wVulC*, *wDil* and control treatments using general mixed-effects Cox model revealed significant differences. While in

control and *wDil* treatments, only 2 mortality cases were observed during the whole experiment, all 30 individuals injected with *wVulC* died within 75 days (Table 2; Figure 2D). Moreover, clear differences in survival curves were reported between males and females injected with *wVulC* (Table 2; Figure 2D). The males infected with *wVulC* died quicker than the females (the TL_{50} was respectively 45 days and 75 days). Since to reproduce *P. d. dilatatus* needs at least 50 days from insemination to the releasing of the young from the marsupium no vertical transmission (*i.e.* from transinfected mother to the progeny) could be possible after the injection of the pathogenic *Wolbachia* strain *wVulC*. As the pathologic effects rose within the first month post injection and that the bacteria would need at least a month to well colonize the ovaries vertical transmission of *wVulC* in *P. d. dilatatus* is clearly not possible.

Wolbachia multiplication in CNS, gonads and hemocytes of *P. d. dilatatus* and *A. vulgare*

In order to assess the global replication dynamics of *Wolbachia* in their hosts, *Wolbachia* quantifications were performed in CNS, gonads and hemocytes (*i.e.* immune cells). These quantifications were performed at 30 days and 60 days post injection for both recipient host species. The bacterial load of *wVulC* in CNS, which is composed of a core of nerve cells surrounded by a sheathing of adipocytes but also in gonads and hemocytes did not significantly differ between the two host species (in CNS at 30 days PI t-test = -1.1901 $df=1$ $p=0.4449$ and at 60 days PI t-test = 1.048 $df=1$ $p=0.4851$; in gonads at 30 days t-test = -1.1758 $df=1$ $p=0.4489$ and at 60 days t-test = 1.4303 $df=1$ $p=0.3884$; in hemocytes at 30 days t-test = -0.5327 $df=1$ $p=0.6884$ and at 60 days t-test = 1.1216 $df=1$ $p=0.4635$; Figure 3A). Moreover, the bacterial loads at 60 days post-injection were similar to those obtained in the CNS, gonads and hemocytes of a naturally infected *A. vulgare* (*i.e.* which received *wVulC* vertically from their mothers) (in CNS t-test = -2.1411 $df=3$ $p=0.1217$, in gonads t-test = 2.635 $df=3$ $p=0.0779$ and in hemocytes t-test = 1.6100 $df=3$ $p=0.2487$; Figure 3A). For individuals of both recipient host species injected with *wDil*, at both 30 days and 60 days post-injections, we showed no significant difference between bacterial load in CNS (at 30 days t-test = 1.0107 $df=1$ $p=0.4966$; at 60

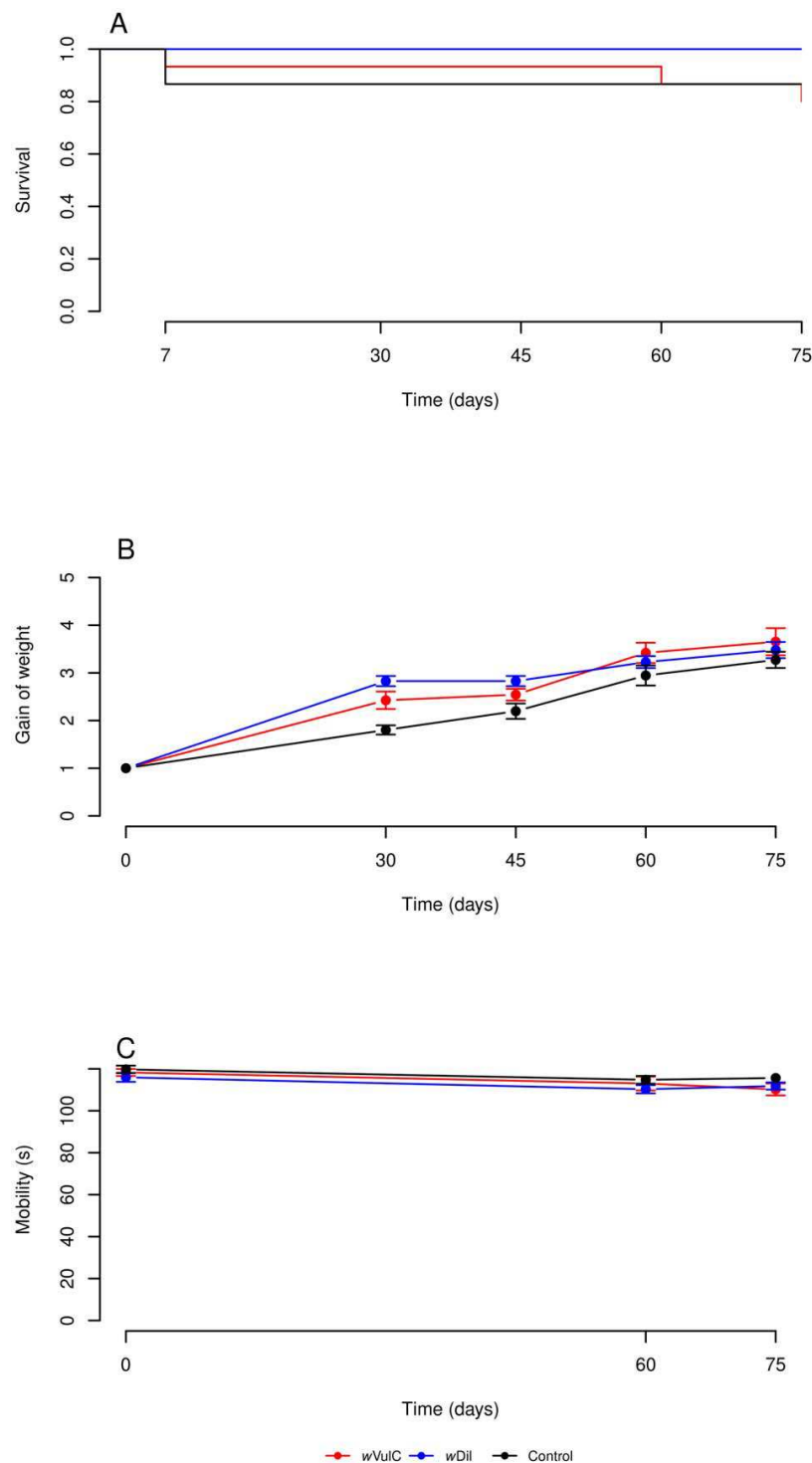


Figure 1. Survival, gain of weight and mobility plots for *Armadillidium vulgare* during 75 days post-injection. There were no significant differences between animals injected with wVulC, wDil or control treatment for all these life history traits: Survival (A), Gain of weight (B) and Mobility (C). doi:10.1371/journal.ppat.1002844.g001

Table 2. Statistical analyses ran on the life history traits data obtained for *P. d. dilatatus* injected by *wVulC* (pure and diluted inoculum), *wDil* and control treatment.

	Factor	Global comparison (control/ <i>wVulC</i> / <i>wDil</i>)			Comparison between effect of <i>wVulC</i> / <i>wDil</i>		
		df	deviance	p	df	deviance	p
Gain of weight (lme analyse)	Sex	1	0.0048	0.9447	1	0.0880	0.7946
	Dose	1	1.3670	0.2423	1	0.5347	0.4646
	Treatment	2	6.5895	0.0370	1	9.6610	0.0018
	Residuals	26	0.0103	#	17	0.0109	#
Mobility (lme analyse)	Sex	1	0.0412	0.8391	1	0.0614	0.8042
	Dose	1	0.2593	0.6105	1	0.1633	0.6861
	Treatment	2	76.6916	<0.0001	1	51.2569	<0.0001
	Residuals	26	7.2512	#	10	7.5134	#
Surface location (glm analyse)	Sex	1	0.0160	0.9004	1	0.0160	0.9004
	Dose	1	0.8160	0.3662	1	0.8160	0.3662
	Treatment	2	173.141	<0.0001	1	118.812	<0.0001
	Residuals	86	19.3036	#	58	19.3036	#
Survival (Cox Model analyse)	Sex	1	8.1314	0.0043	1	9.1004	0.0025
	Dose	1	0.1081	0.7422	1	0.1901	0.6627
	Treatment	2	39.8903	<0.0001	1	37.2365	<0.0001
	Residuals	26	0.0083	#	17	0.0083	#

The gain of weight and mobility were compared between treatments at 60 days post-injection with a Gaussian linear mixed-effects model with randomized block effect fitted by maximum likelihood (ML). For comparison of the *P. d. dilatatus* location in boxes between treatments through the whole experiment, a generalized linear model with binomial error and logit link function was performed. Survival curves were compared using a general mixed-effects Cox model with randomized block effect as for *A. vulgare*.

doi:10.1371/journal.ppat.1002844.t002

days t-test = 1.088 $df = 1$ $p = 0.4732$; Figure 3B). In the other tested tissues (*i.e.* gonads and hemocytes), we obtained significant differences when comparing the *wDil* quantification at 60 days post-injection between transfected *P. d. dilatatus* and *A. vulgare* (in gonads t-test = 2.9053 $df = 5$ $p = 0.0335$ and in hemocytes t-test = -2.9867 $df = 5$ $p = 0.0305$; Figure 3B). In these two cases, *wDil* densities were higher in the native host *P. d. dilatatus* than in *A. vulgare* (Figure 3B).

The quantifications also showed that the density of *wDil* in CNS of all injected animals from both host species or in naturally infected *P. d. dilatatus* was always ten to a hundred times lower than the density of *wVulC* injected in the same animals or in naturally infected *A. vulgare* (t-test = -37.0596 $df = 4$ $p < 0.0001$).

Autophagic vesicles accumulation in nervous cells of *P. d. dilatatus* infected by *wVulC*

For *A. vulgare* individuals injected with either *wDil* or *wVulC* but also for those which were naturally infected with *wVulC*, nerve cells from the CNS and adipocytes but also gonads observed by transmission electron microscopy at both 30 and 60 days post-injections were normal (*i.e.* nucleus and organelles exhibited normal shapes, no autophagic phagosomes and only few lysosomes were present in the cytoplasm). The same cell types observed in *P. d. dilatatus* injected with its native *Wolbachia* strain *wDil* at both 30 and 60 days post-injections were also normal. By contrast, strong alterations of the structure of the cells were observed only in the CNS and adipocytes but not in gonads of *P. d. dilatatus* injected with *wVulC*. At 30 days post injection, in both adipocytes and nerve cells, we observed some *Wolbachia* cells and high densities of autophagosomes and autolysosomes which are characteristic of autophagic process (Figure 4A and 5A). Moreover, in one nerve

cell, we specifically observed the formation of an autophagosome around a *Wolbachia* cell (Figure 4A). At 60 days post injection, the autophagic process observed in the nerve cells and adipocytes clearly amplified compared to what was observed at 30 days post-injections. The CNS cells were severely damaged. Both nerve cells and adipocytes were filled with autophagic vesicles and the organelles were less visible because of a complete disorganization of the cytoplasm (Figure 4B and 5B). To have an additional confirmation of the occurrence of autophagy, we applied the antibody labelling kit LC3B (Invitrogen) on adipocytes of *A. vulgare* and *P. d. dilatatus* injected with *wVulC* or *wDil*. This approach confirmed a high autophagic activity in the adipocytes collected in *P. d. dilatatus* individuals that were injected with *wVulC* (Figure 5C). For such individuals, we observed highly labeled spherical structures that would reflect the incorporation of the LC3B protein in the phagophores. This kind of phagophore was very rarely observed for *A. vulgare* and for other treatments in *P. d. dilatatus* (Figure 5D).

Discussion

While *Wolbachia* are typically transmitted vertically within host populations, it is increasingly recognized that horizontal transfer between host species plays an important role in the evolutionary dynamics of these endosymbionts in arthropods [11]. In this study, we aimed at assessing the potential change in virulence of a *Wolbachia* strain (*wVulC*) immediately after horizontal transfer into a new host, as well as characterizing the causes of this virulence change. We show that after experimental transfer of *wVulC* from its native terrestrial isopod host species (*A. vulgare*) to a closely related one (*P. d. dilatatus*), the virulence increases so much that it

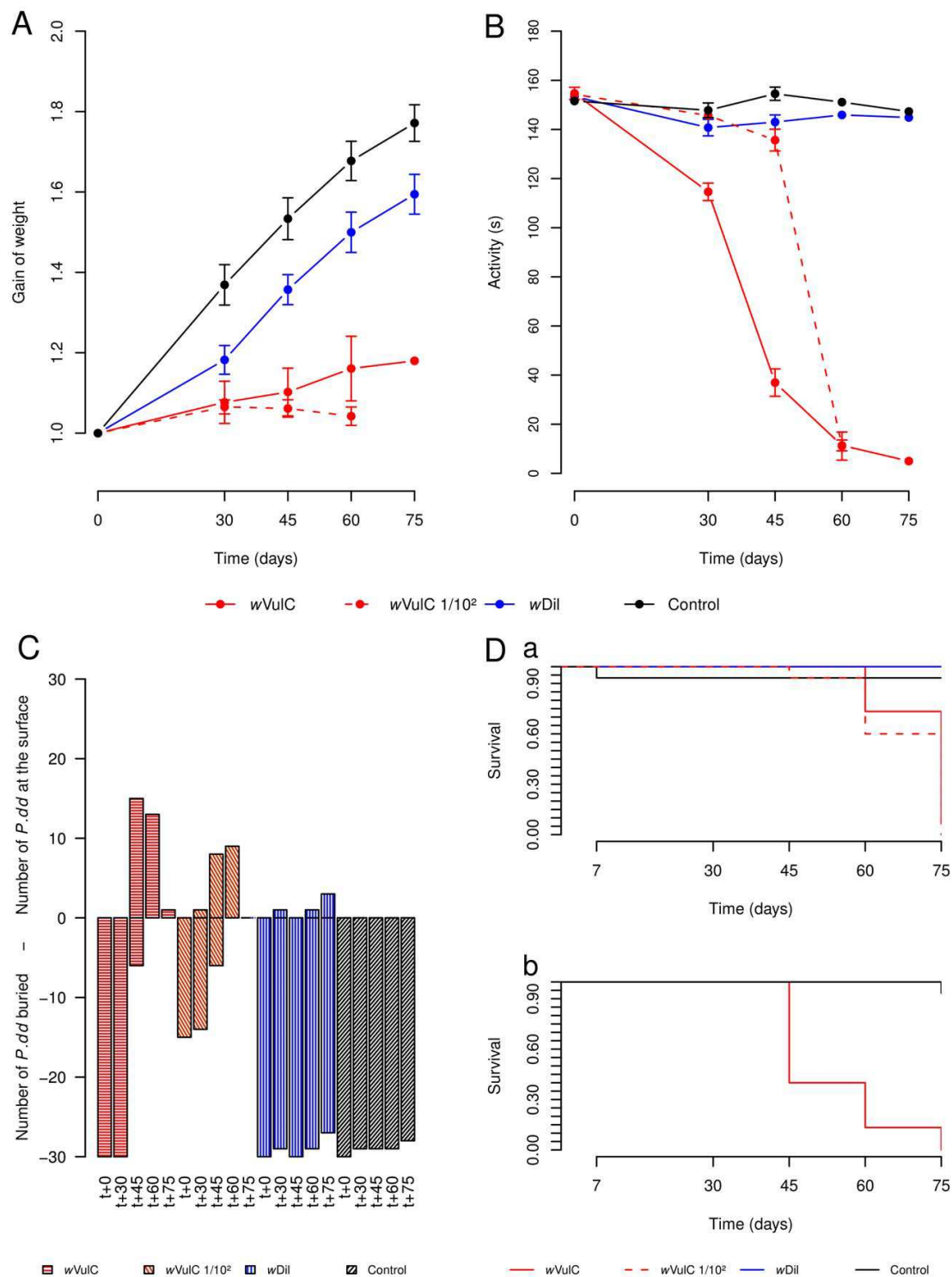


Figure 2. Gain of weight, mobility, burying, survival plots for *Porcellio dilatatus*. Animals were injected by pure suspension of wVulC, diluted wVulC inoculum (only for females), wDil or control treatment and monitored during 75 days post-injection. (A) Gain of weight: Both *Wolbachia* strains negatively impact this parameter compared to the control treatment. However, wVulC (*i.e.* pure or 1/100 diluted inoculum) induces a lower growth

rate than the native strain *wDil*. (B) Mobility: this parameter is dramatically reduced for animals injected by *wVulC* compared to those from other treatments. On the opposite, injection of *wDil* has no significant effect on the host's mobility. (C) Burying behaviour: The level 0 corresponds to the surface of the substrate, negative values correspond to the number of buried animals while positive values correspond to the number of animals found at the surface of the substrate. For control treatment animals, not a single individual rose up at the surface and for individuals injected by *wDil* only few animals were spotted at the surface. When inoculated by *wVulC*, all animals rose up to the substrate after 60 days. (D) Survival (a) data for females and (b) data for males: The injection of *wVulC* kills all the individuals. However, the males die quicker than the females. No extra-mortalities were reported for injection with *wDil* compared to control treatment.
doi:10.1371/journal.ppat.1002844.g002

becomes a pathogen. Such a high virulence is remarkable and is reminiscent of the observations made for another *Wolbachia* strain, *wMelPop* which causes early death of both its native and foreign hosts [21–23]. In the case of *wMelPop*, this high virulence has been proposed to be caused by an abnormally high bacterial load in host cells, especially in nerve ones [21]. Along with high loads of *wMelPop* in nerve cells, important behavioural modifications have been recorded after horizontal transfer followed by vertical transmission in mosquitoes, suggesting an alteration of the central nervous system (CNS) [24,25]. In the present study, the characterization of symptoms such as paralysis, seizures and leg tremors observed prior to the death of *P. d. dilatatus* injected by *wVulC*, led us to hypothesize that the sickness induced by this *Wolbachia* strain could also involve nervous system disorders.

The quantifications of the *Wolbachia* in the main organs of both *A. vulgare* and *P. d. dilatatus* individuals that received the bacteria

either vertically from their mothers or horizontally by experimental injection strengthened this hypothesis. We found that *wVulC* which is virulent in *P. d. dilatatus* exhibited bacterial loads in the CNS that were at least 10 times higher than those reached by the avirulent *wDil*. Therefore, similarly to what was observed for *wMelPop*, the high bacterial loads reached by *wVulC* in the CNS certainly constitutes one component of its high virulence. The multiplication of intracellular bacteria in nerve cells as a cause of CNS diseases has also been extensively described in vertebrates [26]. Interestingly, most of the intracellular bacteria that cause such diseases belong to the group of Rickettsiales, to which *Wolbachia* also belongs [26,27]. Some of these Rickettsiales, such as *Rickettsia sp.* have even been shown to be responsible for diseases like encephalitis and meningitis in humans [26]. It is also noteworthy that symptoms similar to those caused by *wVulC* and *wMelPop* in arthropods such as reduction of movements,

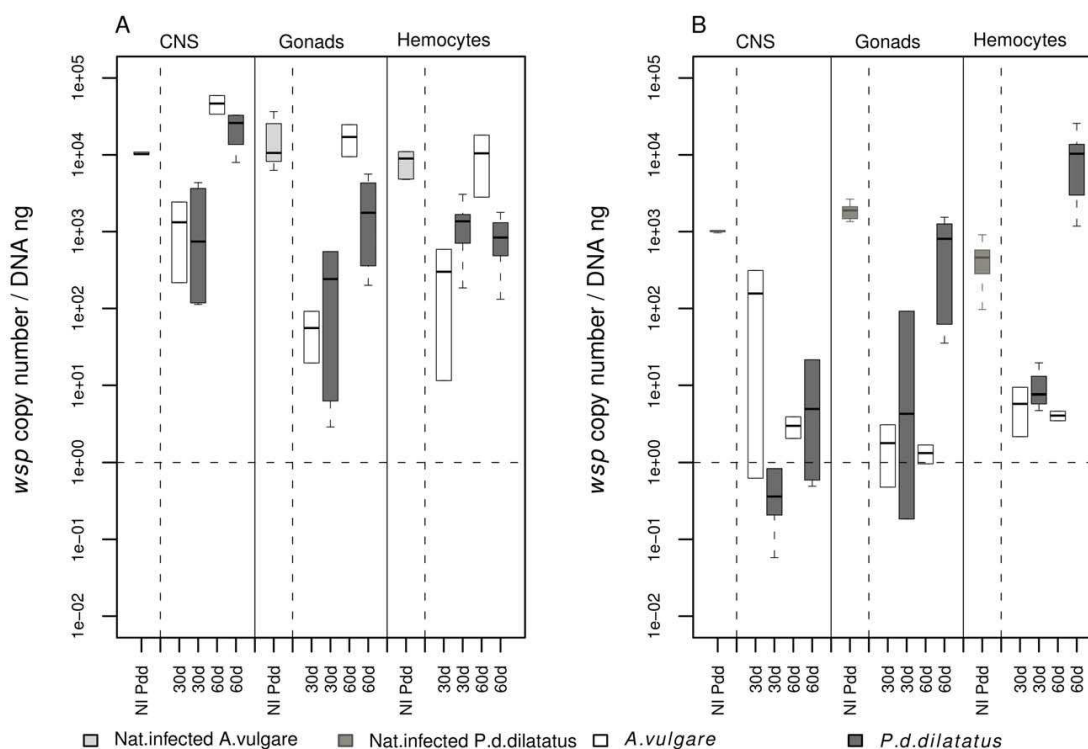


Figure 3. *Wolbachia* loads in CNS, gonads and hemocytes of *Porcellio d. dilatatus* and *Armadillidium vulgare*. (A) Comparison between (i) *P. d. dilatatus* in dark grey and *A. vulgare* in white injected with *wVulC* and (ii) naturally infected *A. vulgare* in light grey revealed no significant differences for the *Wolbachia* loads in CNS cells, gonads and hemocytes (i.e. immune cells), at both 30 and 60 days post-injection. (B) Comparison between (i) *P. d. dilatatus* in dark grey and *A. vulgare* in white injected with *wDil* and (ii) naturally infected *P. d. dilatatus* in dim grey revealed no significant differences for the *Wolbachia* loads in CNS cells at both 30 and 60 days PI. However, at 60 days post-injection, for gonads and hemocytes *wDil* loads were significantly higher in the native host *P. d. dilatatus* than in *A. vulgare*. A global comparison between *wDil* and *wVulC* loads showed that *wVulC* (A) always exhibited higher bacterial loads than *wDil* (B) in both host species.
doi:10.1371/journal.ppat.1002844.g003

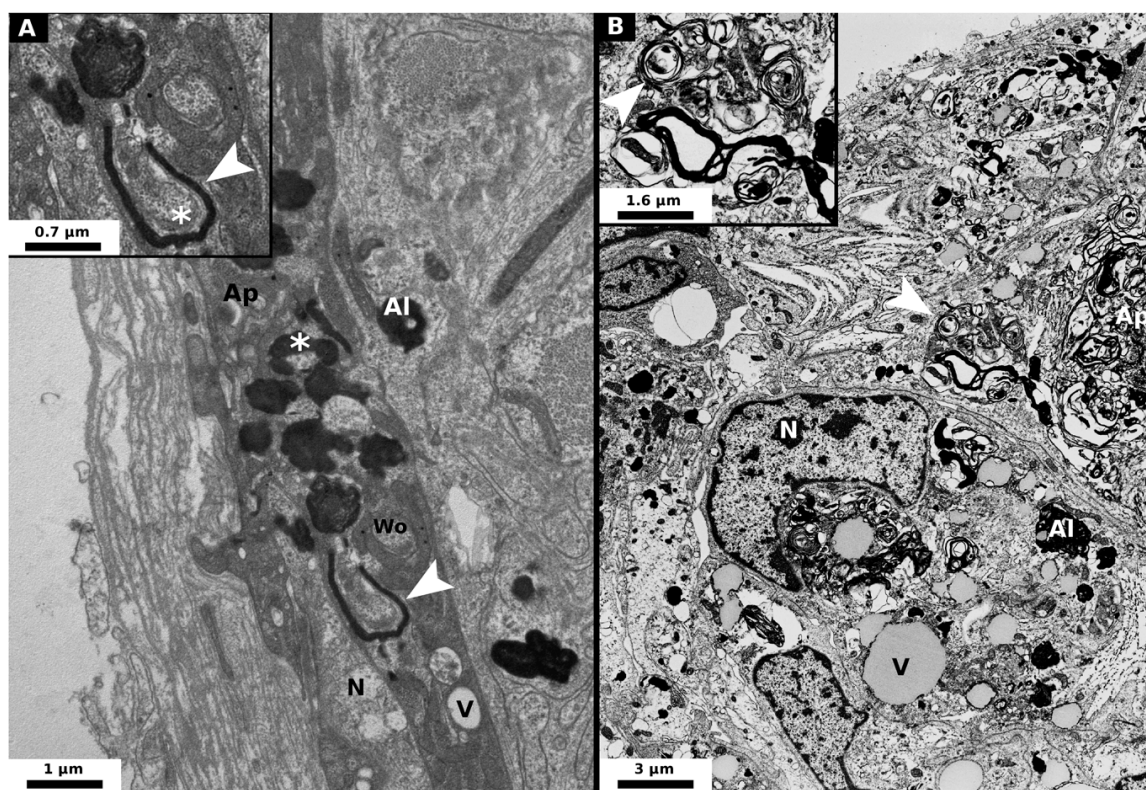


Figure 4. Micrograph of nerve cells of *Porcellio d. dilatatus* injected by *wVulC*. These cells are localised in the CNS ganglion. (A) At 30 days post-injection, some autolysosomes and bacteria are visible: autophagic process is already quite high compared to control [N: Nucleus, V: Vacuole, Ap: Autophagosomes (Autophagic hallmark), Al: Autolysosomes, Wo: *Wolbachia*, *: a *Wolbachia* which seems to be surrounded by an autolysosome, Arrow head: magnified area]. (B) At 60 days post-injection, the nerve cells are severely damaged by the accumulation of autophagic vesicles (N: Nucleus, V: Vacuole, Ap: Autophagosomes (Autophagic hallmark), Al: Autolysosomes, Arrow head: magnified area and probably a *Wolbachia* in autophagic degradation).
doi:10.1371/journal.ppat.1002844.g004

uncontrolled tremors and inability to feed properly have been described in important CNS diseases caused by Rickettsiales in other animals [24,26,28].

Nevertheless high bacterial loads in CNS but also in gonads and hemocytes are unlikely to fully explain the pathogenesis caused by *wVulC* in *P. d. dilatatus* because *A. vulgare* individuals infected vertically or horizontally with this strain survive similar infection pattern [19]. Indeed, *wVulC* reaches similar bacterial loads in the main organs of both its native and foreign host suggesting that both isopod species have an overall similar resistance [14]. We therefore suspected that the pathogenicity of this strain towards *P. d. dilatatus* could be mostly due to a lower ability of this foreign host to tolerate the multiplication of *wVulC* compared to *A. vulgare* [14,29]. One hypothesis would be that *A. vulgare*, through vertical co-evolution with *wVulC*, has increased its ability to tolerate the high bacterial loads in its CNS. By contrast, *P. d. dilatatus* could not evolve towards tolerating high bacterial loads in its CNS because it vertically co-evolved with a strain (*wDil*) that exhibits much lower bacterial loads in this organ than *wVulC*.

The main factor explaining the different virulence of *wVulC* observed between the two isopod species would thus be the way infected tissues respond to the multiplication of *wVulC*. In agreement with this hypothesis, electron microscopy and LC3B

labelling revealed marked differences in the autophagic response of the host cells between *A. vulgare* and *P. d. dilatatus*. While in the former species both adipocytes and nerve cells did not show any sign of deregulated autophagy, in *P. d. dilatatus*, we observed that these two different cell types were completely filled with autophagic vesicles, resulting in a profound disorganization of their cytoplasm. These observations suggest that in addition to high bacterial loads in the CNS cells, the disproportionate autophagic response of these cells is likely to be a major component of the CNS disease caused by *wVulC* in *P. d. dilatatus*.

Autophagy even if really conserved among eukaryotes has only quite recently been considered as a way to regulate intracellular parasites [30]. A role for autophagy in the response to *Wolbachia* infection has not previously been clearly described, but a recent paper described the presence of autophagosomes putatively involved in the degradation of dying *wMelpop* in ovaries of *D. melanogaster* [31]. Moreover, *Anaplasma phagocytophilum*, a pathogen closely related to *Wolbachia*, has been shown to manipulate its host's autophagic machinery [32]. Given the importance of autophagy as a multi-pronged defense against intracellular microbes, we propose that the pathogenic effect of *wVulC* onto *P. d. dilatatus* could be an immunopathology characterized by *Wolbachia*-induced disturbance of host autophagic processes, as

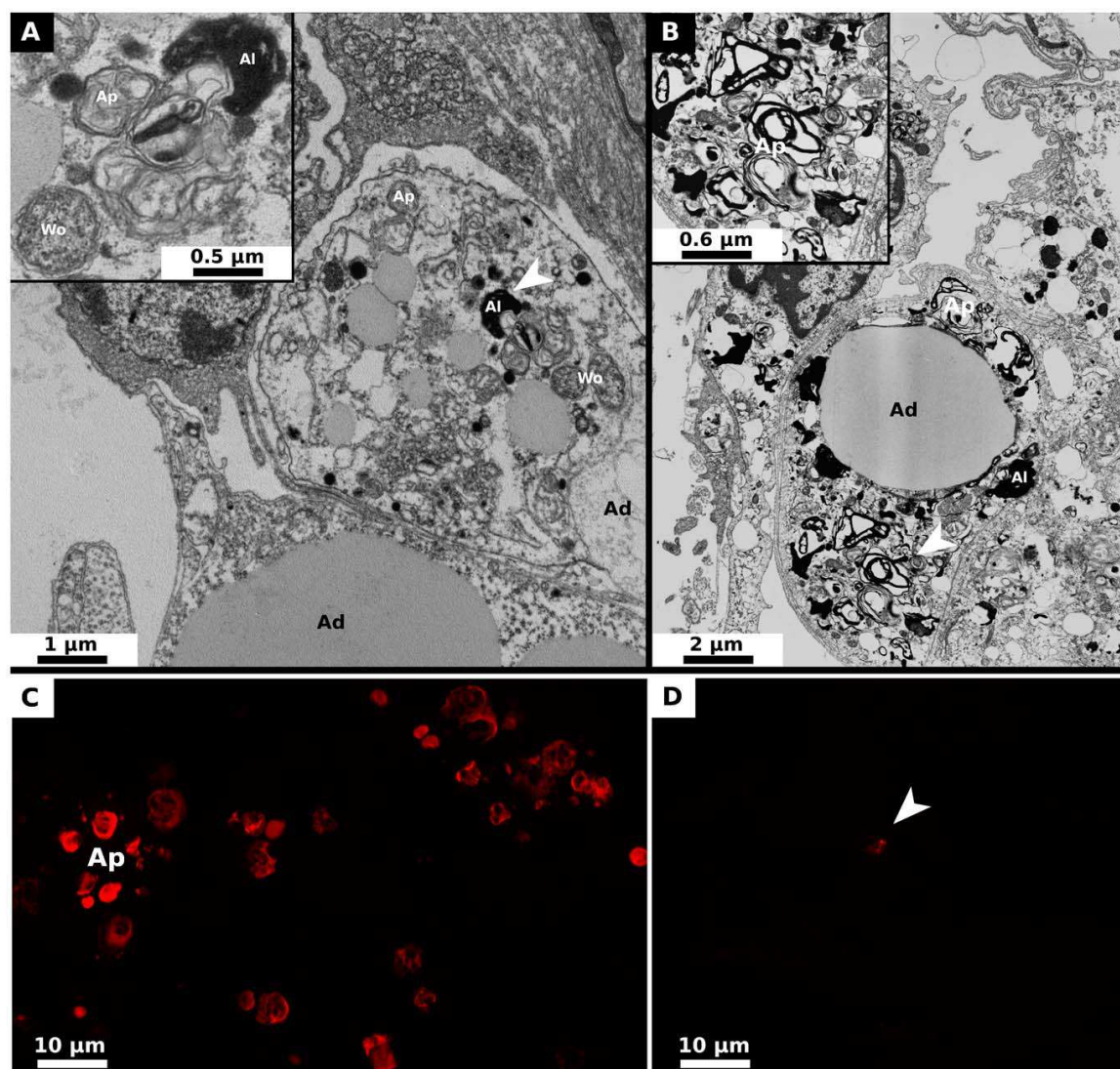


Figure 5. Micrograph and LC3B antibody labelling of adipocytes neighboring the nerve cells of *Porcellio d. dilatatus*. These adipocytes are localised around the nerve cells of the CNS and constitutes the sheathing of this organ. (A) At 30 days post-injection, autolysosomes, autophagosomes but also bacteria were observed: autophagic process was already higher compared to the control (Ad: adipocyte, Ap: Autophagosomes (Autophagic hallmark), Al: Autolysosomes, Wo: *Wolbachia*, Arrow head: magnified area). (B) At 60 days post-injection, the adipocytes were severely damaged by the accumulation of autophagic vesicles (Ad: adipocyte, Ap: Autophagosomes, Al: Autolysosomes, Wo: *Wolbachia*, Arrow head: magnified area). (C) With the antibody labelling anti-LC3B, the protein LC3B implicated in autophagic processes was detected in adipocytes of *P. d. dilatatus* injected with wVulC at 45 days post-injection. The highly labeled spherical structures would reflect the incorporation of the LC3B protein in the phagophores. (D) With adipocytes of *P. d. dilatatus* injected by wDil but also in other tested situations, only really few of these structures were detected by epifluorescence microscopy.
doi:10.1371/journal.ppat.1002844.g005

already described for other intracellular pathogens [33,34]. The mechanism that causes the activation of an apparently unregulated autophagic response in this novel host is not known. However, for *Anaplasma phagocytophilum*, a previous study has unveiled the importance of the type IV secretion system (T4SS) in the induction and subversion of autophagy [35,36]. In the genome of *wVulC* strain, genes corresponding to the minimum components for a typical and functional type IV secretion system (T4SS)

were identified [37,38]. This suggests that *wVulC* factors that trigger autophagy may use the T4SS system as an effector translocator to reach their targets. We can thus hypothesize that the strong autophagic response in *P. d. dilatatus* that causes nerve cells destruction could be due to reaction of the host towards the abnormally intense multiplication of *wVulC* in its CNS but also to the production of particular toxins possibly shuttled *via* T4SS. Moreover, it cannot be excluded that the expression of some

wVulC effectors could change when the bacteria are transected from native to new host and that this differential expression could play a role in the difference observed in host reactions.

In this study, we show that the *Wolbachia* strain *wVulC* becomes highly virulent when it jumps from its native host (*A. vulgare*) to a new host (*P. d. dilatatus*). This increase in virulence is linked to an apparently unregulated autophagic reaction in the new host which is not observed in the same conditions for the native one. These results suggest that *A. vulgare*, which vertically co-evolved with *wVulC* better tolerates the presence of this bacterium in its cells. In conclusion, our experiments uphold the hypothesis according to which tolerance could be a better evolutionary strategy to counteract parasite damage than activating a putative resistance pathway such as autophagy, which as a double-edged sword can hurt the host and increases the virulence of the parasites.

Materials and Methods

Ethic statement

All experimental procedures and animal manipulations did not require an ethics statement.

Biological materials

All the animals used in this experiment were grown at 20°C in plastic breeding boxes, in natural photoperiod, on moistened potting mix derived from peat from sphagnum moss (pH = 6.4 and conductivity = 50.0 mS/m) with dead lime-tree leaves as a food source. In such laboratory conditions, animals can normally live up to 3 years, whether they are infected or not by *Wolbachia*. The recipient hosts of all experiments were aposymbiotic (*i.e.* without any *Wolbachia*) *Armadillidium vulgare* (originating from the city of Helsingør in Denmark and reared in the laboratory since 1991) and *Porcellio dilatatus dilatatus* which were collected at the village of Rom in Deux-Sèvres (France) in 1988 and reared since then in the laboratory. As donors of the native strain *wDil*, we used another lineage of *P. d. dilatatus* naturally infected by *Wolbachia*. These animals were originated from the Sainte-Marguerite Island in Alpes-Maritimes (France) and reared in the laboratory since 2007. As donors of the *Wolbachia* strain *wVulC*, symbiotic *Armadillidium vulgare* originating from the city of Helsingør (Denmark) and reared in the laboratory since 1991 were used.

Wolbachia injection experiments

Aposymbiotic *A. vulgare* (females of 6 months-old) and *P. d. dilatatus* (females and males of 6 months-old) were infected by *wVulC*, *wDil* or by a control treatment. For each batch of injection, ovary suspensions were prepared with the ovaries of (i) 5 *A. vulgare* symbiotically associated with *wVulC*; (ii) 5 *P. d. dilatatus* symbiotically associated with *wDil* or (iii) 5 *A. vulgare* that did not host *Wolbachia* for control treatment. The ovaries were collected and crushed into 1 ml of Ringer solution. The resulting suspension was filtered through a 1.2 µm pore membrane, and 1 µL of each filtrate was injected in a small hole pierced in each individual cuticle, using a thin glass needle, into the general cavity, at the posterior part of animals [39]. This protocol was applied to inject 3 independent batches of individuals per treatments (*i.e.* injection of *wVulC*, *wDil* or control). Animals were then used for life history traits measurements, *Wolbachia* quantifications, electron microscopy and LC3B antibody labeling.

Animals injected for life history trait measurements

Thirty individuals *per* treatment for *P. d. dilatatus* (*i.e.* 15 males and 15 females) and 15 females *per* treatment for *A. vulgare* were monitored for life history measurements. To be able to demon-

strate that the effect of *wVulC* was not due to higher doses injected compared to *wDil*, 15 *P. d. dilatatus* females were injected with a *wVulC* suspension diluted 100 times with filtered sterile Ringer. For all these animals, life-history traits were recorded during 75 days after the injection.

Animals injected for *Wolbachia* quantifications

Twelve individuals *per* treatment for *P. d. dilatatus* (*i.e.* 6 males and 6 females) and 6 females *per* treatment for *A. vulgare* were injected for *Wolbachia* quantifications. Half of the animals were used for *Wolbachia* quantification at 30 days post-injection and the other half for *Wolbachia* quantification at 60 days post injection.

Animals used for electron microscopy and LC3B labeling

For each host species 18 individuals *per* treatment were injected to observe the adipocytes and the nerve cells but also oocytes by electron microscopy at 30 (6 individuals for each treatment) and 60 days (6 individuals for each treatment) post-injection and to perform LC3B labeling antibody kit to characterize autophagic vesicles in adipocytes at 45 days post injections (6 individuals for each treatment).

Measurements of the different life history traits

For each condition and host species the life history traits were recorded for 75 days post-injection (until the last individuals infected by *wVulC* died for *P. d. dilatatus*). The first measurement was performed at $t=0$ then 30 days after the injection. The following measurements were then performed every 15 days until the final one after 75 days. The gain of weight was calculated for each animal at each point by weighting them on a precision balance ($d=0.001$ g) and dividing the weight at the time $t=x$ by the weight at time $t=0$. The mobility test was performed by measuring the time during which an individual moves in a glass Petri dish onto a period of 180 s. For *P. d. dilatatus*, only we determined the number of individuals located at the surface versus the number of buried animals after opening the breeding box by counting the number of animals found at the substrate and those which were buried. The survival rate was measured by counting the number of live animals for each treatment.

Tissue samples and DNA extraction for *Wolbachia* quantification

Total DNA was extracted from the Central Nervous system (CNS) (*i.e.* nerve cells and neighbouring adipocytes), the gonads and the hemocytes of each individual as described by Kocher *et al.*, [40] after dissections. For each sample, the concentration and quality (ratios OD 260/280 nm and 260/230 nm) of the extracted DNA were measured using the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo).

Quantification of *Wolbachia* in host's tissues

The quantification of *Wolbachia* by quantitative PCR (qPCR) was performed at 30 and 60 days post-injection to follow the time course of the infections before the death of all *P. d. dilatatus* infected by *wVulC* but after apparition of the first symptoms. All the qPCR amplifications were performed with DNA sampled from the CNS (*i.e.* nerve chord = nerve cells and neighbouring adipocytes), the gonads and the hemocytes. To allow a comparison between animals injected by *Wolbachia* and those which received the bacteria vertically from their mother; we also performed qPCR quantification on respectively 5 females *A. vulgare* naturally infected with *wVulC* and 5 females *P. d. dilatatus* naturally infected with *wDil*. All the qPCR reactions were performed using Roche

LIGHTCYCLER 480 under the following conditions in 10 μ L: 5 μ L of SYBRGreen MasterMix (Roche), 0.5 μ L of 10 μ M specific primers *wsp*208f (5'- TGG-TGC-AGC-ATT-TAC-TCC-AG-3') and *wsp*413r (5'-TCG-CTT-GAT-AAG-CAA-AAC-CA-3'), which amplified 205 bp of a single-copy of the gene *wsp*, 3 μ L of sterile water and 1 μ L of DNA (between 10 ng and 80 ng of DNA). The thermal cycling used an initial denaturation period of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of denaturing temperature at 95°C for 10 s, the annealing temperature for the reaction was 60°C for 10 s and 72°C for 20 s. A melting curve (65°C to 97°C) was recorded at the end of each reaction in order to check that the PCR product was unique. Efficiency of the PCR reaction was calculated. Standard curve was plotted using 7 dilutions of *wsp* purified PCR product (*wsp* copies. μ L⁻¹: 2.63×10^0 , 2.63×10^1 , 2.63×10^2 , 2.63×10^3 , 2.63×10^4 , 2.63×10^5 , 2.63×10^6 , 2.63×10^7). *wsp* copy number was estimated by calculation in reference to the standard curve. The total DNA quantity (*i.e.* host+*Wolbachia*) of each sample was used to normalize *wsp* gene copy number. The results are thus given in number of *wsp* copies by ng of total DNA. For each condition (individual*organ**Wolbachia* strain), two independent technical replicates were performed.

wsp gene amplification and sequencing for *wVulC* strain

In the inoculum and in animals injected with *Wolbachia* 60 days post-injection, we verified that only the expected *Wolbachia* strain was present (*i.e.* *wDil* or *wVulC*). To do so, a 610 bp fragment of the *wsp* region of the *Wolbachia* DNA was amplified using the specific primers *wsp*81F and *wsp*691R (81F 5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC and 691R 5'- AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA) [41]. The PCR cycling conditions were 95°C for 2 min followed by 35 cycles (95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min) and 72°C for 5 min. Double strand PCR products were purified using 2 μ L of a mix containing two enzymes: 0.05 μ L of Antarctic Phosphatase (AnP, 1 u/ μ L; New England Biolabs, NEB, USA) and 0.1 μ L of Exonuclease I (0.5 u/ μ L; NEB, USA) and incubation at 37°C for 1 hour and 80°C for 20 min. Purified DNA fragments were sequenced using the Big Dye v3.1 Terminator Sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), visualizing results on an ABI 310 automated sequencer. For each sample, *wsp* sequences were obtained from both strands and compared between them and with the reference sequence of *wDil* and *wVulC*.

Electron microscopy

To date, the most reliable way to characterize autophagy is the visualization by TEM of the formation of double membrane cytosolic vesicles called autophagosomes which sequesters cytoplasm and delivers it to the lysosome for degradation and are considered as the hallmark of autophagy [30,42]. To observe CNS cells and gonads by TEM, 6 animals from each host species (*i.e.* *A. vulgare* and *P. d. dilatatus*) and from each treatment (injected by *wVulC*, injected by *wDil*, or injected by an ovary suspension containing no *Wolbachia*) were individually sampled 30 and 60 days post-injection. Tissues were fixed (9% glutaraldehyde, 0.3 M sodium cacodylate, 3% NaCl, v/v/v) for 2 hours at 4°C. Tissues were washed (0.3 M sodium cacodylate, 3% NaCl, 0.8 M sucrose, v/v/v) for 2 hours at 4°C. Post-fixation was performed into 4% OsO₄, 0.3 M sodium cacodylate, 5.5% NaCl for 45 min. Tissues were subsequently dehydrated through a graded series of acetone solutions, infiltrated and embedded in resin (Spurr, Polyscience Inc.). Thick sections (0.5 μ m) were stained with 1% toluidin blue for light microscopy observation. Thin sections (90 nm) were contrasted by incubation in 1% uranyl acetate in 50% ethanol for

1 min, then stained with lead citrate [43]. Sections were observed using a transmission electron microscope (JEOL 100C).

LC3B labeling antibody

The LC3B protein plays a critical role in autophagy. Normally, this protein resides in the cytosol, but following cleavage and lipidation with phosphatidylethanolamine, LC3B associates with the phagophore. This localization can be used as a general marker for autophagic membranes. To visualize the LC3B, we used the LC3B Antibody Kit for Autophagy (Invitrogen). As this kit was designed to work with cell coming from cell culture it was not possible to perform it on the full CNS. We thus only performed LC3B labeling on adipocytes from the nerve chord which form a loose tissue that can be more easily penetrated by antibodies. To perform this labeling, we first deposited individually part of fat tissue containing adipocytes collected in: 6 *A. vulgare* naturally infected by *wVulC*, 6 *A. vulgare* injected by *wVulC*, 6 *P. d. dilatatus* injected by *wDil* and 6 *P. d. dilatatus* injected by *wVulC* (at 45 days post-injection) onto microscope slides harboring a 200 μ L drop of 3.7% formaldehyde in PBS. The fat tissue samples were then incubated in fixative for 15 minutes at room temperature. The fixative was then removed and the adipocytes washed three times with PBS. After the last washing, 200 μ L of 0.2% Triton X-100 in PBS were deposited onto the cells. The permeabilization buffer was then removed and 200 μ L of the primary antibody (0.5 μ g/mL in blocking BSA buffer) were deposited onto the cells and incubated for 1 hour at room temperature. The primary antibody was then removed and the samples washed again three times with PBS. The samples were then placed with 200 μ L of an anti-rabbit secondary antibody (0.5 μ g/mL in blocking BSA buffer) and incubated for 1 hour at room temperature. Samples were mounted in Citifluor (AFI antifading, Citifluor, England). Detection was performed with a Carl Zeiss epifluorescent microscope (Axio Observer.Z1) with Apotome and AxioVision 4.8.1 software (Zeiss) equipped with a 63X objective (oil immersion).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 2.10.1, 2009-12-14). For all life-history traits, we first adjusted a model to our data which includes sex, dose (*i.e.* the number of *Wolbachia* injected), and treatments (control, *wVulC* or *wDil*). We then re-adjusted the same model after having removed the control treatment from the data set, which allowed us to compare between the effects of *wVulC* and *wDil*. As the experiments were performed on three independent groups of individuals, a randomized block effect has been taken into account in the models when possible. This last analysis showed that the inter-block variance was very low indicating that measures were repeatable between blocks. The gain of weight and mobility were compared between treatments at 60 days post-injection with a Gaussian linear mixed-effects model with randomized block effect fit by maximum likelihood (ML) (lme function in nlme package [44]). For comparison of the animals' location in the boxes between treatments through the whole experiment, a generalized linear model with binomial error and logit link function was performed. In these analyses, the data were collected from simultaneous observations of all the individuals from a same rearing box. The comparison was thus made between groups of 6 boxes and not between individuals, it was thus not necessary to add a random effect in this model. Survival curves obtained with the different treatments were compared using a general mixed-effects Cox model with randomized block effect (coxme fonction in kinship package). *Wolbachia* density in tissues of *A. vulgare*, *P. d. dilatatus* and naturally infected animals were

compared with t-test because data distribution followed a normal distribution and variances of the samples were homogeneous.

Supporting Information

Video S1 Behavioral film showing the symptoms encountered in *P. d. dilatatus* after the injection of the *ΔVulC* strain. Animals exhibited surfacing behavior, lack of mobility and several symptoms as seizures, leg tremors and paralysis. (MP4)

References

- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W (2008) The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet* 42: 683–707.
- Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42: 587–609.
- Jaenike J (2007) Fighting back against male-killers. *Trends Ecol Evol* 22: 167–169.
- Huigens ME, Luck RF, Klaassen RH, Maas MF, Timmermans MJ, et al. (2000) Infectious parthenogenesis. *Nature* 405: 178–179.
- Bouchon D, Cordaux R, Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: Bourtzis K, Miller T, editors. *Insect symbiosis*. pp. 273–294.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6: 741–751.
- Poinsot D, Mercot H (1997) *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans*: does the females host bear a physiological cost? *Evolution* 51: 180–186.
- Engelstädter J, Hurst GDD (2009) The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40: 127–149.
- Lipsitch M, Siller S, Nowak MA (1996) The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution* 50: 1729–1741.
- Bonds MH (2006) Host life-history strategy explains pathogen-induced sterility. *Am Nat* 168: 281–293.
- Kraaijeveld K, Franco P, De Knijff P, Stouthamer R, Van Alphen JJM (2011) Clonal genetic variation in a *Wolbachia*-infected asexual wasp: horizontal transmission or historical sex? *Mol Ecol* 20: 3644–3652.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* 261: 55–63.
- Lipsitch M, Moxon ER (1997) Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends Microbiol* 5: 31–37.
- Schneider DS, Ayres JS (2008) Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 8: 889–895.
- Juchault P, Legrand JJ, Martin G (1974) Action interspécifique du facteur épigénétique féminisant responsable de la thélygénie et de l'intersexualité du Crustacé *Armadillidium vulgare* (Isopode Oniscoïde). *Annales d'Embryologie et de Morphogenèse* 7: 265–276.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P (1998) Evidence of widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci* 265: 1081–1090.
- Chevalier F, Herbinière-Gaboreau J, Bertaux J, Raimond M, Morel F, et al. (2011) The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: Meeting with their invaders, *Wolbachia*. *PLoS One* 6: e18531.
- Rigaud T, Souty Grosset C, Raimond R, Mocquard JP, Juchault P (1991) Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): Recent acquisitions. *Endocytobiosis and Cell Res* 7: 259–273.
- Braquart-Varnier C, Lachat M, Herbinière J, Johnson M, Caubet Y, et al. (2008) *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One* 3: e3286.
- Sicard M, Chevalier F, De Vlehouwer M, Bouchon D, Grève P, et al. (2010) Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and *Wolbachia*. *Naturwissenschaften* 97: 819–826.
- Min KT, 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.
- Reynolds KT, Thomson LJ, Hoffmann AA (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.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, et al. (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323: 141–144.
- McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O'Neill SL (2002) *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2918–2923.
- Moreira LA, Saig E, Turley AP, Ribeiro JMC, O'Neill SL, et al. (2009) Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e568.
- Drevets DA, Leenen PJM, Greenfield RA (2004) Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17: 323–347.
- Treadwell TA, Holman RC, Clarke MJ, Krebs JW, Paddock CD, et al. (2000) Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1993–1996. *Am J Trop Med Hyg* 63: 21–26.
- Ratnasamy N, Everett ED, Roland WE, McDonald G, Caldwell CW (1996) Central nervous system manifestations of human ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 23: 314–319.
- Corby-Harris V, Habel KE, Ali FG, Promislow DEL (2007) Alternative measures of response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 20: 526–533.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463–477.
- Zhukova MV, Kiseleva E (2012) The virulent *Wolbachia* strain *wMelPop* increases the frequency of apoptosis in the female germline cells of *Drosophila melanogaster*. *BMC Microbiol* 12 Suppl 1: S15.
- Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, et al. (1987) Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med* 316: 853–856.
- Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7: 767–777.
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27–42.
- Niu H, Yamaguchi M, Rikihisa Y (2008) Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 10: 593–605.
- Rikihisa Y, Lin M (2010) *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Curr Opin Microbiol* 13: 59–66.
- Félix C, Pichon S, Braquart-Varnier C, Braig H, Chen L, et al. (2008) Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for type IV secretion machinery in *Wolbachia* of *Armadillidium vulgare*. *Res Microbiol* 159: 481–485.
- Pichon S, Bouchon D, Cordaux R, Chen L, Garrett RA, et al. (2009) Conservation of the Type IV Secretion System throughout *Wolbachia* evolution. *Biochem Biophys Res Comm* 385: 557–562.
- Rigaud T, Juchault P (1995) Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J Evol Biol* 8: 249–255.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, et al. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6196–6200.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 180: 2373–2378.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, et al. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4: 151–175.
- Reynolds E S (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208–212.
- Lindstrom MJ, Bates DM (1988) Newton-Raphson and EM Algorithms for Linear Mixed-Effects Models for Repeated-Measures Data. *J Am Stat Assoc* 83: 1014–1022.

Acknowledgments

We thank all the technical staff of the UMR CNRS 7267 and S. Guillot for technical assistance. We also thank Dr. J. Bertaux for helping to design the project, Dr. F.J. Richard for her assistance in the establishment of the mobility test and Dr. C. Gilbert for comments on previous version of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MS DB WL CBV. Performed the experiments: WL MR MS CBV. Analyzed the data: WL JBF MR MS. Wrote the paper: WL MS JBF CBV DB.

2 Conclusion

Le transfert horizontal de *wVulC* chez *P. d. dilatatus* induit de nombreux symptômes, constatés peu de temps après l'injection. En effet, les animaux présentent une paralysie des appendices locomoteurs ainsi que des tremblements et convulsions associés à une incapacité à s'enfouir dans le substrat. L'ensemble de ces symptômes suggère de sévères troubles neurologiques chez les receveurs tandis que les hôtes natifs injectés en sont exempts. Bien que ces troubles nerveux ne soient pas sans rappeler ceux observés chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Min & Benzer 1997) ou bien chez le moustique *Aedes aegypti* (Moreira *et al.* 2009b) infecté par la souche de *Wolbachia* *wMelPop*, les quantifications effectuées dans les tissus nerveux, gonadiques et immunitaires révèlent que la souche *wVulC* se multiplie de manière aussi intense chez le receveur que chez l'hôte natif, sans que cela n'affecte les traits d'histoire de vie ce dernier. Ce résultat suggère à première vue une résistance globale équivalente de *P. d. dilatatus* et *A. vulgare* vis à vis de *wVulC* dans le sens où la multiplication du symbiote est similaire dans les deux hôtes (Schneider & Ayres 2008). L'une des hypothèses proposée visant à expliquer ce résultat serait liée à la coévolution entre la souche *wVulC* et *A. vulgare*. Ce dernier aurait acquis la capacité à tolérer le symbiote et son importante multiplication, notamment dans le système nerveux central (SNC), ce qui n'est pas le cas de *P. d. dilatatus* qui, de surcroît, héberge une souche native, *wDil*, colonisant beaucoup moins le tissu nerveux. De ce fait, les conflits émergents de la multiplication des symbiotes et de la réponse de l'hôte receveur seraient la cause du glissement vers l'interaction hôte / pathogène avec, d'un côté, un symbiote qui conserve une capacité de colonisation des tissus similaire à celle observée chez son hôte natif et de l'autre, un nouvel hôte qui tente de résister à cette présence et y laisse la vie. Chez *P. d. dilatatus*, les observations en microscopie électronique du tissu nerveux mettent en évidence une très importante réaction autophagique induisant la destruction des cellules nerveuses. De manière habituelle, l'autophagie est un processus utilisé par la cellule pour se débarrasser

d'organites vieillissants, de protéines mal conformées ou bien encore de pathogènes intracellulaires (Levine & Klionsky 2004). Par ailleurs une récente étude a démontré que les processus autophagiques permettent de réguler les taux de *Wolbachia* dans les tissus de la mouche *D. melanogaster*, du moustique *Aedes albopictus* et du nématode filaire *Brugia malayi* (Voronin *et al.* 2012). Les résultats obtenus dans le tissu nerveux de *P. d. dilatatus* en microscopie ont été confirmés par un marquage anti-LC3B (protéine impliquée dans les réactions autophagiques) particulièrement intense dans le tissu adipeux entourant le SNC.

En résumé, la présence de *wVulC* chez *P. d. dilatatus* est associée à une dérégulation des processus autophagiques entraînant une immunopathologie, liée à la destruction du tissu nerveux du receveur et expliquant les symptômes rencontrés (Levine & Deretic 2007 ; Levine & Kroemer 2008). Si la différence de tolérance du receveur peut être mise en cause dans l'apparition de cette maladie, il ne faut pas pour autant totalement exclure la part des changements qui peuvent se produire chez le symbiote lorsqu'il passe d'un hôte à l'autre ! Nous n'avons pas d'éléments pour étayer cette hypothèse mais il se peut que l'expression de certains facteurs soit modifiée par les symbiotes lors du changement d'hôtes. Il est par exemple possible d'envisager que ces facteurs libérés dans les cellules de *P. d. dilatatus* via le système de sécrétion de type IV (Félix *et al.* 2008 ; Pichon *et al.* 2009) jouent un rôle de toxines perturbant les processus autophagiques comme c'est d'ailleurs le cas chez la bactérie intracellulaire *Anaplasma phagocytophilum*, phylogénétiquement proche de *Wolbachia* (Niu *et al.* 2008 ; Rikihisa & Lin 2010). Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure que le transfert horizontal ait entraîné des modifications dans l'expression des gènes bactériens (peut être grâce à des mécanismes épigénétiques tels que des modifications dans la méthylation de l'ADN) plus ou moins profondes en réponse à son nouvel environnement (le nouvel hôte receveur) et que ces changements soient également impliqués dans les modifications du niveau de virulence de *wVulC* lorsqu'elle est introduite chez *P. d. dilatatus*.

Injectée chez *P. d. dilatatus*, la souche de *Wolbachia* *wVulC* native d'*A. vulgare* induit une maladie pour le receveur se traduisant par l'apparition de nombreux symptômes nerveux et la mort des individus. D'importantes réactions autophagiques entraînant la destruction du tissu nerveux apparaissent comme impliquées dans l'apparition de ces symptômes pathologiques. Nous avons ici mis en évidence que *wVulC* est capable de coloniser tous les organes d'un nouvel hôte. Le filtre de compatibilité est donc en partie ouvert mais le fort effet pathogène de cette souche de *Wolbachia* rend l'association caduque et referme finalement définitivement ce filtre. De nombreuses questions restent encore en suspens : Les *Wolbachia* vont-elles, en général, se multiplier dans tous les tissus de leurs hôtes (natif ou receveur) ? Existe-t'il des *Wolbachia* possédant de plus fortes capacités de multiplication que d'autres ? Par ailleurs, le taux de multiplication est-il une caractéristique propre d'une souche de *Wolbachia* quelque soit l'hôte mis en jeu ? Est-il fréquent lors de transferts horizontaux de voir apparaître de très fortes tensions entre les *Wolbachia* et leurs hôtes receveurs, menant à des niveaux de virulence non compatibles avec la transmission verticale ?

Troisième partie

De la plasticité chez les *Wolbachia*

Les crustacés isopodes terrestres possèdent la particularité d'être infectés par de nombreuses souches de *Wolbachia*, induisant deux types de phénotypes étendus : l'incompatibilité de croisement (IC) et la féminisation des mâles. Cette diversité des souches et des effets a été utilisée dans ce chapitre dans le but d'étudier les impacts des transferts horizontaux de *Wolbachia* sur différentes espèces de receveurs phylogénétiquement distantes mais également de voir si ces associations temporaires pourraient former, sur le long terme, des interactions durables transgénérationnelles. En effet, pour qu'une symbiose se maintienne et perdure, il faut que le symbiote parvienne à se transmettre au fil des générations, soit de manière verticale, soit de manière horizontale (Bright & Bulgheresi 2010). Cependant, ces deux modes de transmission ne sont pas exclusifs (Bright & Bulgheresi 2010) et l'existence des transferts horizontaux a été largement démontrée chez des symbiotes ayant une voie de transmission majoritairement verticale (Cordaux *et al.* 2001 ; Lim-Fong *et al.* 2008 ; Reuter & Keller 2003 ; Sachs *et al.* 2011 ; Werren *et al.* 1995), comme par exemple chez l'endosymbiote *Wolbachia* (Bandi *et al.* 1998 ; Cordaux *et al.* 2001 ; Jeyaprkash & Hoy 2000 ; Werren *et al.* 2008). Ces transferts horizontaux peuvent mener à la formation de nouvelles symbioses, entre partenaires non initialement coadaptés. Une fois passé le filtre de rencontre, les bactéries nouvellement arrivées chez un receveur vont se heurter à deux autres types de filtres : le filtre de compatibilité (ou filtre physiologique) et le filtre de transmission (Combes 1995). Dans certains cas, des transferts horizontaux expérimentaux de *Wolbachia* ont montré que ces bactéries sont capables de s'installer malgré l'éloignement phylogénétique du nouvel hôte (Clancy & Hoffmann 1997 ; Grenier *et al.* 1998 ; Le Clec'h *et al.* 2012 ; McMeniman *et al.* 2008 ; Xi *et al.* 2006). En revanche, la transmission aux générations suivantes est beaucoup plus rare, avec la majeure partie du temps, une disparition de l'infection après quelques générations (Grenier *et al.* 1998). Cependant, la souche transférée peut parfois s'installer durablement en se transmettant à la descendance et en manipulant la reproduction de son nouvel hôte, cas rencontré

chez le moustique *Aedes albopictus* transinfecté avec la souche de *Wolbachia* *w*Ri provenant de *Drosophila simulans* (Xi *et al.* 2006). Nous avons vu dans la deuxième partie du manuscrit, qu'un transfert horizontal d'une souche de *Wolbachia* chez un receveur pouvait engendrer d'importantes modifications du niveau de virulence de l'endosymbiote. Les objectifs de ce second chapitre, divisé en deux grandes parties, ont été (i) de tester la plasticité des différentes souches de *Wolbachia* en terme de capacité d'adaptation (ou d'acclimatation) à un nouvel environnement (les receveurs) et de colonisation des organes des receveurs (ii) de montrer si d'autres cas de changement de virulence (dans un sens ou dans l'autre) peuvent être observés lors d'un transfert horizontal et si ces niveaux de virulence sont dépendants de divers paramètres tels que la nature du tissu assurant le transfert, la souche mise en jeu ou bien encore les doses de bactéries inoculées et enfin (iii) d'évaluer la capacité des souches transférées horizontalement à se transmettre verticalement à la descendance, permettant ainsi le maintien, à travers les générations, de ces néosymbioses.

Chapitre 1

Lorsque les *Wolbachia* rencontrent l'isopode terrestre *Porcellio* *dilatatus dilatatus*

1 Introduction

Dans ce premier chapitre, ont été analysés les résultats issus des transinfections indépendantes chez le receveur *P. d. dilatatus* à l'aide de huit souches de *Wolbachia* d'isopodes terrestres induisant soit de l'incompatibilité de croisement soit une féminisation des mâles chez leurs hôtes natifs respectifs. Les objectifs de cette étude ont été (i) de tester la plasticité d'implantation de toutes ces souches, relativement distantes phylogénétiquement (Cordaux *et al.* 2012) chez un même receveur (ii) de montrer si cette colonisation est associée à des changements dans les niveaux de virulence puis finalement (iii) d'évaluer les possibilités de transmission verticale suite à ces transferts horizontaux.

From horizontal to vertical symbiont transmission : Multiple *Wolbachia* strains forced to live with a new host.

In review for publication in *Evolution*

Winka Le Clec'h, Maryline Raimond, Sylvain Guillot, Didier Bouchon,
Mathieu Sicard

The *Wolbachia* infect a wide host range in which they navigate vertically from mothers to offspring. However, horizontal transfers also occur between hosts widening *Wolbachia* host range. To unravel the parameters prevailing upon the success or failure of such transfers, we transfected 8 *Wolbachia* strains, responsible for feminization or cytoplasmic incompatibility in their native terrestrial isopod hosts, to asymbiotic *P. d. dilatatus*. We showed that all *Wolbachia* strains infected all tested organs. However, some *Wolbachia* strains exhibited low titers while others exhibited high titers. Among the transfected *Wolbachia*, the feminizing strains *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* induced profound perturbations of life history traits and eventually killed the recipient hosts, definitively preventing their vertical transmission to the offspring. Such high virulence appears not be directly linked to higher bacterial loads but to the host reaction towards these feminizing strains. The other *Wolbachia* strains that were not pathogenic were vertically transmitted to the offspring but did not modify brood size and sex-ratio. The bacterial loads in offspring were quite variable suggesting that some new associations might be lost in later generations. However, some transfected *Wolbachia* strains exhibited high transmission rates and titers that might lead to long-lasting interactions at the evolutionary scale.

Key words : Endosymbiont, horizontal transfers, vertical transfers, virulence, woodlouse

1.1 Introduction

Symbiosis is one of the most common interactions between organisms and represents a major evolutionary force leading to many adaptations for both partners (Douglas 2010). The maintenance of symbioses basically relies on the ability of symbionts to transmit through host generations (Bright & Bulgheresi 2010). Two main routes for symbiont transmission have been defined : the horizontal transmission, where the host acquires the symbiont from its environment, and the vertical transmission mode, where the symbiont is inherited by the offspring from their mother,

or, more rarely, from both parents (Bright & Bulgheresi 2010). Both transmission modes are not mutually exclusive and a symbiont can exhibit a mixed pattern of transmission, for instance a main route of vertical transmission and occasional horizontal transfers. Such horizontal transfer events can occur (i) from free-living symbiont populations, (ii) between individuals from the same host species (i.e., intraspecific level) or (iii) between individuals from different host species (i.e., interspecific level) (Bright & Bulgheresi 2010). Co-phylogenetic analysis is a classic way to study the occurrence of horizontal transfers at the evolutionary scale. This kind of analyses shows that horizontally transmitted symbioses often exhibit a lack of congruence between host and symbiont phylogenies (Sachs *et al.* 2011 ; Vrijenhoek 2010 ; Won *et al.* 2008) while vertically transmitted symbioses tend to be more congruent (Baumann 2005 ; Dale & Moran 2006 ; Matsuura *et al.* 2012 ; Moya *et al.* 2008 ; Sachs *et al.* 2011). However, some incongruence can also be detected in the phylogeny of vertically transmitted symbioses (Cordaux *et al.* 2001 ; Lim-Fong *et al.* 2008 ; Reuter & Keller 2003 ; Sachs *et al.* 2011 ; Werren *et al.* 1995) suggesting the occurrence of some horizontal transfers between and within host species.

Wolbachia pipientis is considered the most widespread vertically transmitted symbiont as it is found associated with the major arthropod groups and some nematodes (Bandi *et al.* 1998 ; Jeyaprakash & Hoy 2000 ; Werren *et al.* 2008). These endosymbiotic bacteria are vertically transmitted from mothers to their offspring and induce numerous reproductive perturbations in their hosts, including cytoplasmic incompatibility (CI) (Serbus *et al.* 2008 ; Werren 1997), *male killing* (Jaenike 2007a), thelytokous parthenogenesis (Huigens *et al.* 2000) and feminization of genetic males (Bouchon *et al.* 2008 ; Cordaux *et al.* 2012). All these perturbations promote the vertical transmission of *Wolbachia* to the next generation. Even if the vertical route is preponderant and enhanced by the capacity of these unculturable bacteria to modify the reproduction of their hosts, horizontal transfers are frequently inferred with the help of phylogenetic markers showing discordance between host

and symbiont genotypes at both the intraspecific (Watanabe *et al.* 2012) and interspecific level (Huigens *et al.* 2004 ; Vavre *et al.* 1999 ; Werren *et al.* 1995). Such horizontal transfers of *Wolbachia* are thought to be increased when donor and recipient hosts are ecologically linked. For instances, Heath *et al.* (1999) revealed that *Wolbachia* can horizontally switch from an infected host (*Drosophila simulans*) to its parasitic wasp (*Leptopinila boulandi*), Rigaud and Juchault (1995) showed that terrestrial isopods (crustaceans) can be experimentally infected with *Wolbachia* via blood contact between wounded animals and Cordaux *et al.* (2001) suggested a *Wolbachia* host-switching between hosts sharing the same habitat. Horizontal transfers can lead to the formation of a new symbiosis between a *Wolbachia* and a host it may not have coevolved with. Following the encounter between the two partners, a multiplication in host tissues is a first step to initiate the symbiosis at the individual scale. Previous studies have demonstrated that *Wolbachia* from flies, wasps and terrestrial isopods can be experimentally transfected from one host species to another and create a persisting infection (Clancy & Hoffmann 1997 ; Grenier *et al.* 1998 ; Le Clec'h *et al.* 2012 ; McMeniman *et al.* 2008 ; Xi *et al.* 2006). The critical point that determines whether the newly formed symbiosis will last at the evolutionary scale is the ability of *Wolbachia* to find its way to the next generation. Xi *et al.* (2006) demonstrated that the *Wolbachia* strain *w*Ri from *Drosophila simulans* was sustainably transferred into the mosquito *Aedes albopictus* and induced CI at a high level (i.e., 90 %) in its new host. Horizontal transfers between *Trichogramma* species showed that they are followed by stable vertical transmissions but with low transmission efficiency (Grenier *et al.* 1998). In terrestrial isopods, horizontal transfers of *Wolbachia* between adults led in most cases to an installation of *Wolbachia* in recipient hosts (Bouchon *et al.* 2008 ; Juchault *et al.* 1974, 1994). However, Rigaud *et al.* (2001) showed that only horizontal transfer of *Wolbachia* between two hosts from the same genus (i.e., *Armadillidium*) leads to vertical transmission of the newly acquired symbiont. This suggests that vertical transmission might only be possible

when donor and recipient species are phylogenetically closely related. *Wolbachia* thus seems to be very versatile and capable of installation in a wide range of hosts. However, the multiplication of *Wolbachia* in these hosts can lead to an increase in virulence. This change in virulence can possibly result from the lack of co-adaptation between the interacting partners, considering that this co-evolutionary process can only occur through generation time (Bonds 2006 ; Lipsitch *et al.* 1996). Recently, Le Clec'h *et al.* (2012) described a situation where a *Wolbachia* strain (*wVulC*) naturally associated with the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* exhibited high virulence when transferred into another isopod species, *Porcellio dilatatus dilatatus*. This virulence is characterized by nervous system disorders followed by death of the recipient host within two months. This change in virulence likely resulted from the perturbation of the host autophagic response, strongly altering the tolerance of the recipient host to its new bacterial passenger (Schneider & Ayres 2008), and turning the interaction into a host-pathogen one.

In the present study, we independently tranfected 8 different strains of *Wolbachia* [four feminizing strains (*wVulC*, *wVulM*, *wPruIII* and *wAs*) and three CI strains (the native strain *wDil*, *wPet*, *wCon*) and one whose effect is still unknown (*wHel*)] into the recipient host *P. d. dilatatus*. At the proximal level, this allowed us to evaluate (i) the ability of these *Wolbachia* to colonize a new host and to which extent, (ii) their patterns of distribution in major host organs and (iii) their virulence (i.e., consequences on life history traits of *P. d. dilatatus*). At the distal level, this allowed the evaluation of (i) the ability of the *Wolbachia* to vertically transmit to next generations of *P. d. dilatatus* (i.e., creation of sustainable symbioses) and (ii) the consequences of the different *Wolbachia* on the host's reproductive success.

Tableau III-1 – *Wolbachia* strains used for horizontal transfers in the recipient host *P. d. dilatatus*.

<i>Wolbachia</i> strain	Native host	Host origin	Extended phenotype	Reference
<i>w</i> VulC	<i>Armadillidium vulgare</i>	Helsingor Danemark	Feminization All infected individuals are phenotypically females	Bouchon <i>et al.</i> (1998)
<i>w</i> VulM	<i>Armadillidium vulgare</i>	Mery sur Cher France	Feminization All infected individuals are phenotypically females	Cordaux <i>et al.</i> (2004)
<i>w</i> PruIII	<i>Porcellionides Pruinosus</i>	Nevers France	Feminization Both females and males are infected	Michel-Salzat <i>et al.</i> (2001)
<i>w</i> As	<i>Oniscus asellus</i>	Quinçay France	Feminization Both females and males are infected	Rigaud <i>et al.</i> (1999)
<i>w</i> Con	<i>Cylisticus convexus</i>	Avanton France	Cytoplasmic incompatibility (CI)	Moret <i>et al.</i> (2001)
<i>w</i> Dil	<i>Porcellio dilatatus dilatatus</i>	St Marguerite France	CI	Grève, <i>pers. com.</i>
<i>w</i> Pet	<i>Porcellio dilatatus petiti</i>	St Honorat France	CI	Legrand <i>et al.</i> (1978)
<i>w</i> Hel	<i>Helleria brevicornis</i>	Bastia France	Unknown	Bouchon <i>et al.</i> (1998)

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Biological materials

All animals used in this experiment were grown in the laboratory at 20°C and natural photoperiod in plastic breeding boxes, on moistened potting mix derived from sphagnum moss peat (pH = 6.4 and conductivity = 50.0 mS/m) with dead lime-tree leaves as food source. In such laboratory conditions, animals can live up to 3 years, whether they are infected or not by *Wolbachia*. In all experiments, the recipient hosts came from an asymbiotic line (i.e., without any *Wolbachia*) of *Porcellio dilatatus dilatatus*, established with individuals sampled in the village of Rom in Deux-Sèvres (France) in 1988. As donors of *Wolbachia* strains for all the horizontal transfers, we used different controlled laboratory lines of donor terrestrial isopods from different species that are natively infected with *Wolbachia* strains that do not have the same effect. The feminizing strains came from (i) two lines of *A. vulgare* (*wVulC* or *wVulM*), (ii) a line of *Porcellionides pruinosus* (*wPruIII*) and (iii) a line of *Oniscus asellus* (*wAs*) while the CI strains came from (i) a line of symbiotic *P. d. dilatatus* (*wDil* referred as native strain), (ii) a line of symbiotic *P. d. petiti* (*wPet*) and (iii) a line of *Cylisticus convexus* (*wCon*) (Table III-1).

1.2.2 *Wolbachia* injection experiments

Asymbiotic *P. d. dilatatus* (6 month-old females and males) were injected with each *Wolbachia* strain using ovary suspension of their donor hosts (Table III-1). For each replicate of injections, ovary suspensions were prepared by collecting ovaries from 5 individuals carrying one of the *Wolbachia* strains (called donors) and from uninfected individuals (control treatment) and by crushing these ovaries into 1mL of Ringer solution. The resulting suspension was filtered through a 1.2 μ m pore membrane (Millipore) and 1 μ L of each filtrate was injected in the recipient host using a thin glass needle. For each replicate of each treatment (i.e., injection of one of the eight *Wolbachia* strains or control) 5 females and 5 males for life-history

trait measurements and (ii) 2 females for *Wolbachia* quantification were injected as described above. Three independent replicates were performed by treatment.

1.2.3 Measurements of life history traits

Life history traits (gain of weight, mobility, burying behaviour and survival) were recorded for thirty injected *P. d. dilatatus* (i.e., 15 males and 15 females, 5 animals per replicate) for each treatment during 200 days post-injection. The first measurement was performed at $t=0$, then 30 days after the injection. The following measurements were then performed every 15 days until 75 days, then every 30 days until the final one at $t_0 + 200$ days. The gain of weight was calculated for each animal at each checkpoint by weighting them on a precision balance ($d=0.001$ g) and dividing the weight at time $t=x$ by the weight at time $t=0$. The mobility was assessed by measuring the time during which an individual moves in a glass Petri dish during a period of 180 seconds. We determined the burying behaviour by the number of individuals located on the surface versus the number of buried animals after opening the breeding box. The survival rate was measured at each time point by counting the number of live animals for each treatment.

1.2.4 F1 progenies from injected females

All the *P. d. dilatatus* females that survived up to 200 days after the transfection with the different *Wolbachia* were crossed with asymbiotic males in separate boxes, at 20°C with stimulating photoperiod (LD 18 : 6) (for the number of crossings for each condition see Table III-2). After at least two months, the juveniles emerged from the ventral marsupial pouch of their mothers. Then, three to four months after their emergence, the sexually differentiated juveniles were collected, counted, sorted according to sex and reared in separate boxes, at 20°C. Six months after, five females of each brood were collected for *Wolbachia* quantification in gonads, nerve cords and hemocytes.

Tableau III-2 – Percentage of females with offspring when injected with different *Wolbachia* strains.

<i>Wolbachia</i> strain	Number of females crossed	Number of females with offspring	Percentage of females with offspring
<i>wAs</i>	31	24	77 %
<i>wCon</i>	26	20	77 %
<i>wDil</i>	22	6	27 %
<i>wPet</i>	29	22	76 %
<i>wHel</i>	31	22	71 %
Control	58	47	81 %

1.2.5 *Wolbachia* quantification

1 *Tissue samples and DNA extraction*

After dissection of each individual, total DNA was extracted from the gonads (i.e., ovaries, route of vertical transmission), the Central Nervous System CNS (i.e., nerve cord : nerve cells and neighbouring adipocytes) and hemocytes [i.e., immune cells, route of horizontal transmission (Rigaud & Juchault 1995)] of each female as described by Kocher *et al.* (1989). For each sample, the concentration and quality (ratios OD 260/280 nm and 260/230 nm) of the extracted DNA were measured using the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo).

2 *Quantification of Wolbachia in host's tissues by qPCR*

Using quantitative PCR, we performed a comparison between (i) the *Wolbachia* loads in organs (i.e., ovaries, nerve cords and hemocytes) of the donor species (5 females per species) (Table III-1) and (ii) the loads of the same *Wolbachia* strains in the same organs of the transfected host *p. dilatatus* (6 females per treatment). For animals injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPrull*, quantifications were performed 60 days after injection (before the death of all *P. d. dilatatus*) while for the other

strains (*wCon*, *wPet*, *wDil*, *wAs* and *wHel*) the quantifications were performed 200 days post-injection (because with these *Wolbachia* strains no extra-mortality were recorded), after the last measurement of life history traits. We also quantified the *Wolbachia* loads in the same organs (i.e., ovaries, nerve cords and hemocytes) in six month-old F1 offspring of injected *P. d. dilatatus* females. All q-PCR reactions were performed using the LightCycler 480 system (Roche) as follows : 10 min at 95°C, 45 cycles of [10 sec at 95°C, 10 sec at 60°C, 20 sec at 72°C]. A melting curve (65°C to 97°C) was recorded at the end of each reaction in order to check that the PCR product was unique. The reaction mixture consisted of 5 μL of SYBRGreen MasterMix (Roche), 0.5 μL of each 10 μM specific primers [wsp208f (5'-TGG-TGC-AGC-ATT-TAC-TCC-AG-3') and wsp413r (5'-TCG-CTT-GAT-AAG-CAA-AAC-CA-3')], which amplified 205 pb of a single-copy of the gene *wsp*, 3 μL of sterile water and 1 μL of DNA (between 10 ng and 80 ng of DNA). A standard curve was plotted using 7 dilutions of *wsp* purified PCR product (*wsp* copies. μL^{-1} : 2.63×10^0 , 2.63×10^1 , 2.63×10^2 , 2.63×10^3 , 2.63×10^4 , 2.63×10^5 , 2.63×10^6 , 2.63×10^7). The number of *wsp* copies was estimated according to the standard curve. The total DNA quantity (i.e., host + *Wolbachia*) of each sample was used to normalize the resulting *wsp* gene copy number. The results are thus given in number of *wsp* copies by ng of total DNA. For each condition (individual $\times$ organ $\times$ *Wolbachia* strain), three independent biological replicates were performed.

1.2.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 2.10.1). For the life-history traits experiments, we first adjusted a model to our data including sex, dose (i.e., the number of injected *Wolbachia* measured by qPCR in inocula), and treatments (i.e., control and type of injected *Wolbachia* stain). We then re-adjusted the same model after having removed the control treatment and the non-pathogenic *Wolbachia* strains from the data set, which allowed us to compare between the effects

of *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII*, which were actually the most pathogenic strains. As the experiments were performed on three independent groups of individuals, a randomized block effect was taken into account in the models when possible. This last procedure showed that the inter-block variance was very low indicating that measures were repeatable between blocks. The gain of weight and mobility were compared between treatments at 75 days and 200 days post-injection with a Gaussian linear mixed-effects model with randomized block effect fit by maximum likelihood (ML) [lme function in nlme package (Lindstrom & Bates 1988)]. For comparison of the burying behaviour between treatments throughout the whole experiment, a generalized linear model with binomial error and logit link function was performed. In these analyses, the data were collected from simultaneous observations of all the individuals from a same rearing box. The comparison was thus made between groups of 6 boxes and not between individuals. Thus, it was not necessary to add a random effect in this model. Survival curves from the different treatments were compared using a general mixed-effects Cox model with randomized block effect (coxme fonction in kinship package). Brood sizes (i.e., F1 offspring) from injected mothers were compared with Welch *t*-test because data followed a Gaussian distribution (Shapiro test, $p > 0.05$) but variances were not homogeneous (Bartlett test, $p < 0.05$). For the Sex-ratio of the progenies, all conditions were met (i.e., Gaussian distribution of data and homoscedasticity of the variances) to realise statistical analyses with *t*-test. *Wolbachia* density in ovaries, nerve cords and hemocytes for naturally infected donor animals, injected *P. d. dilatatus* and their F1 offspring were compared with non-parametric pairwise comparison Wilcoxon test because data distribution did not follow a Gaussian distribution.

Tableau III-3 – Effect of the injection of 8 different *Wolbachia* strains on *P. d. dilatatus*'s life history traits.

75 days post-injection														200 days post-injection					
	Factor	df	Between all treatments		Between all treatments except <i>w</i> VulC, <i>w</i> VulM and <i>w</i> PruIII injections			Between all treatments			Between all the strains except <i>w</i> PruIII								
			deviance	p	df	deviance	p	df	deviance	p	df	deviance	p						
Gain of weight (lme)	Sex	1	7.3126	0.0068	1	1.5812	0.2085	1	24.1399	<0.0001	1	15.9795	<0.0001						
	Dose	7	3.2172	0.8642	4	3.4487	0.4857	5	23.1801	0.0003	4	20.4899	0.0003						
	Treatment	8	37.6294	<0.0001	5	8.8220	0.1163	6	57.6110	<0.0001	5	28.0948	<0.0001						
	Residuals	254	0.0096	#	215	0.0097	#	228	0.0112	#	215	0.0106	#						
Mobility (lme)	Sex	1	4.3103	0.0378	1	4.7395	0.0294	1	0.3771	0.5391	1	0.8250	0.3637						
	Dose	7	0.1890	0.9999	4	0.2902	0.9904	5	1.5967	0.9016	4	1.5480	0.8181						
	Treatment	8	214.6401	<0.0001	5	7.0801	0.2147	6	214.3928	<0.0001	5	8.4295	0.1340						
	Residuals	254	8.0061	#	215	6.1638	#	228	7.7694	#	215	7.8068	#						
Surface location (glm)	Sex	1	0.0410	0.8397	1	0.2000	0.6558	1	2.0700	0.1502	1	2.0700	0.1502						
	Dose	7	2.2680	0.1321	4	1.7200	0.1898	5	1.8610	0.1924	4	1.8610	0.1924						
	Treatment	8	253.293	<0.0001	5	11.1700	0.0480	6	42.8700	<0.0001	5	42.8750	<0.0001						
	Residuals	254	3.1574	#	215	12.5432	#	228	10.3420	#	215	15.2910	#						
Survival (Cox model)	Sex	1	2.0803	0.1492	1	0.0001	0.9910	1	0.2095	0.6741	1	1.4036	0.2361						
	Dose	7	1.6661	0.1967	4	0.4051	0.9820	5	3.9256	0.5607	4	2.9416	0.5676						
	Treatment	8	48.6261	<0.0001	5	4.0265	0.5456	6	81.3951	<0.0001	5	5.6582	0.3409						
	Residuals	254	0.0544	#	215	0.0025	#	228	0.0012	#	215	0.0013	#						

1.3 Results

1.3.1 Alteration of *P. d. dilatatus*'s life history traits by *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII*

1 *Gain of weight*

The first global analysis, including all treatments, performed with data obtained 75 days post-injection showed that the variance in gain of weight between samples was mostly explained by differences between treatments (i.e., control and injection of each of the different *Wolbachia* strains) but also the sex of the recipient individuals (Table III-3; Fig. III-1 A, B). However, after having removed individuals injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* from the analysis, significant differences were no longer observed between other treatments, showing that only these three injected strains were significantly slowing down the gain of weight of *P. d. dilatatus* at this time point. Comparisons between the gain of weight of individuals injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* showed no significant differences revealing that, at this time point, these three strains were similarly affecting the growth of *P. d. dilatatus* (Table III-4). A second global analysis was run on results recorded 200 days post injection, after the death of all animals injected with *wVulC* and *wVulM* (Table III-3; Fig. III-1 A, B). This analysis showed that the variance in gain of weight was again mostly explained by the kind of treatment and the sex of the recipient host. Even after having removed the individuals injected by *wPruIII* from the dataset, significant differences between treatments were still observed (Table III-3). Further analysis with lme model showed that the native strain *wDil* was the fourth strain also responsible for a significant slowdown of the gain of weight. The other *Wolbachia* strains or the control treatment did not affect growth (Fig. III-1 A, B).

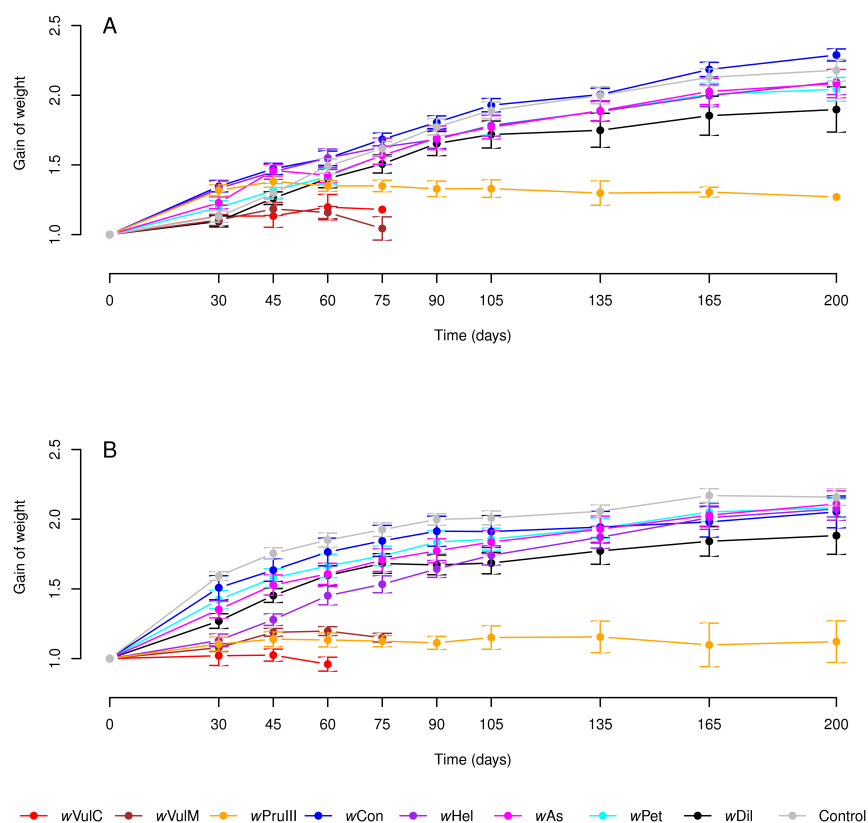


FIGURE III-1 – Gain of weight for *Porcellio d. dilatatus* (A) females and (B) males during 200 days post-injection. Animals (females or males) were injected with all the *Wolbachia* strains described in Table III-1 or control treatment. *wVulC*, *wVulM*, *wPruIII* and *wDil* strains all negatively impact the growth of individuals compared to the control treatment or to the other *Wolbachia* strains.

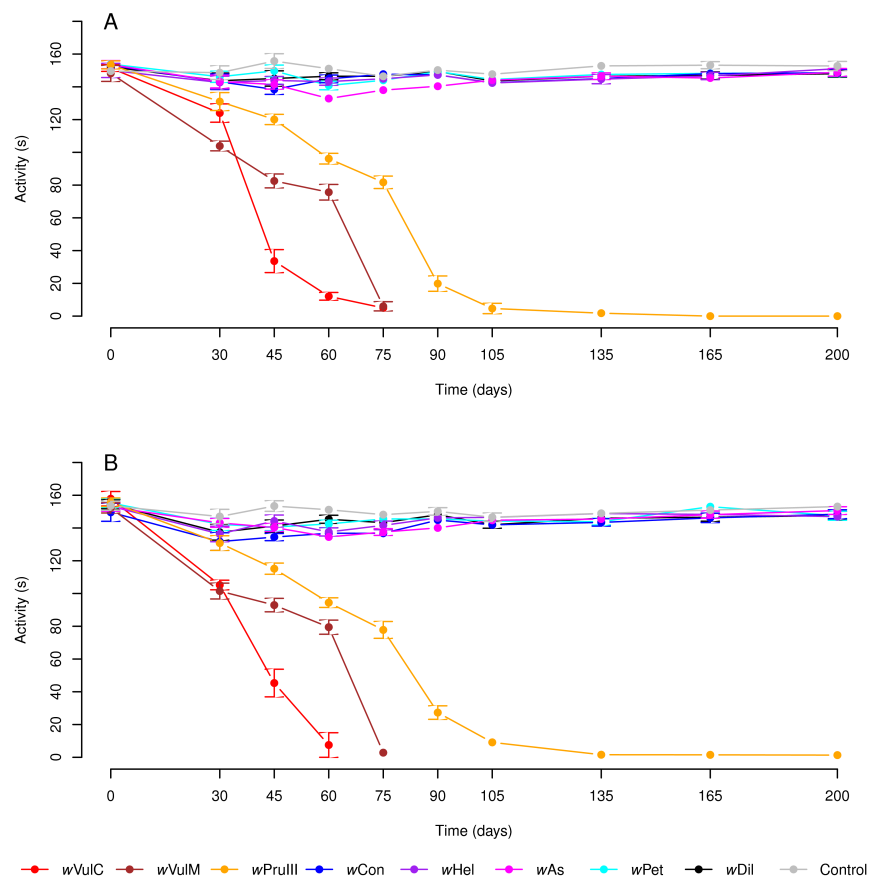


FIGURE III-2 – Mobility time over 180 s observations of *Porcellio d. dilatatus* (A) females and (B) males during 200 days post-injection. Animals (females or males) were injected with all the *Wolbachia* strains described in Table III-1 or control treatment. Mobility of *Porcellio d. dilatatus* injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* is dramatically reduced.

2 Mobility

The first global analysis, including all treatments, performed with data obtained 75 days post-injection showed that the variance in mobility between animals was mostly due to treatments but also to the sex of the recipient host (Table III-3 ; Fig. III-2 A, B). When data of individuals injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* were removed from the analysis, no significant difference between the other treatments was detected, showing that reduction of mobility of injected animals was only caused by these 3 *Wolbachia* strains (Table III-3 ; Fig. III-2 A, B). Indeed, starting from 45 days post-injection, *P. d. dilatatus* recipients of *wVulC*, *wVulM* and

Tableau III-4 – Comparison between the effect of $wVulC$, $wVulM$ and $wPruIII$ on *P. d. dilatatus*'s life history traits at 75 days post-injection.

	Factor	Comparison between $wVulC$ and $wVulM$			Comparison between $wVulC$ and $wPruIII$			Comparison between $wVulM$ and $wPruIII$		
		df	deviance	p	df	deviance	p	df	deviance	p
Gain of weight (lme)	Dose	1	0.8585	0.3541	1	0.1085	0.7418	1	0.2614	0.6091
	Treatment	1	0.1285	0.7199	1	0.4651	0.4952	1	0.0955	0.7572
Mobility (lme)	Dose	1	2.2460	0.1339	1	9.0385	0.0026	1	4.7082	0.0300
	Treatment	1	3.9301	0.0483	1	16.8315	<0.0001	1	14.9395	0.0001
Surface location (glm)	Dose	1	1.8691	0.2139	1	14.4520	0.0059	1	14.4520	0.0059
	Treatment	1	13.1130	0.0002	1	13.1130	0.0002	1	13.1130	0.0002
Survival (Cox Model)	Dose	1	1.5448	0.2139	1	0.5211	0.4703	1	4.8172	0.0281
	Treatment	1	4.1644	0.0312	1	10.8481	0.0009	1	8.8172	0.0081

$wPruIII$ developed asthenia (i.e., they seemed “lax”), suffering from seizures and leg tremors. Comparison of the effect of $wVulC$, $wVulM$ and $wPruIII$ on mobility revealed a gradual effect (Table III-4) : The Time Activity 50 TA_{50} , corresponding to the time required to decrease mobility to 50 % was respectively of (i) 37 days for females and 34 days for males injected with $wVulC$, (ii) 45 days for males and females injected with $wVulM$ and (iii) 70 days for females and 60 days for males injected with $wPruIII$. The same global analysis ran at 200 days post-injection, after all individuals injected with $wVulC$ and $wVulM$ had died, showed that the only parameter that still significantly explained the variance in mobility was the type of treatment and no longer the sex of the recipient host. However, when the results obtained with individuals injected with $wPruIII$ were removed from the model, no significant difference was observed between the other treatments (Table III-3 ; Fig. III-2 A, B), showing that only $wVulC$, $wVulM$ and $wPruIII$ significantly impacted this life history trait throughout the whole experiment.

3 *Burying behaviour*

Another impact of the *Wolbachia* injections on the behaviour of *P. d. dilatatus* concerned their location in the substrate (Le Clec'h *et al.* 2012) : The behaviour of asymbiotic *P. d. dilatatus* is to bury themselves into the substrate, while after injection of *Wolbachia*, some males and females rose to the surface. A binomial general linear model showed that the factor that mostly explained the variance in location was again the type of *Wolbachia* strain injected, both with results obtained 75 days and 200 days post-injection (Table III-3 ; Fig. III-3). Starting from 45 days post-injection, most of the individuals injected with *wVulC*, *wVulM* or *wPruIII* were found at the surface while most of the individuals injected with other *Wolbachia* stayed buried (Table III-4 ; Fig. III-3). The Time Surface 100 TS₁₀₀, corresponding to the time required for all animals to be spotted at the surface was respectively of 60 days for individuals injected with *wVulC*, 75 days for individuals injected with *wVulM* and 90 days for individuals injected with *wPruIII* (Table III-4). For the other treatments, only few animals were observed at the surface over 75 days Post-Injection (PI). However, all the individuals injected with *Wolbachia* rose significantly more to the surface than those that received the control treatment for which no individual was observed at the surface over the 200 days period of observation (Table III-3 ; Table III-4 ; Fig. III-3).

4 *Survival*

The symptoms described above in the *P. d. dilatatus* injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* (i.e., decrease in gain of weight, mobility and burying behaviour) were followed by death for 100 % of the animals injected with *wVulC* and *wVulM* and 78 % of animals injected with *wPruIII* at 200 days post-injection (Table III-3 ; Fig. III-4). Comparison of survival plots between groups of individuals of *P. d. dilatatus* injected with different *Wolbachia* strains and control treatments using general mixed-effect Cox model revealed significant differences. During 75 days post-

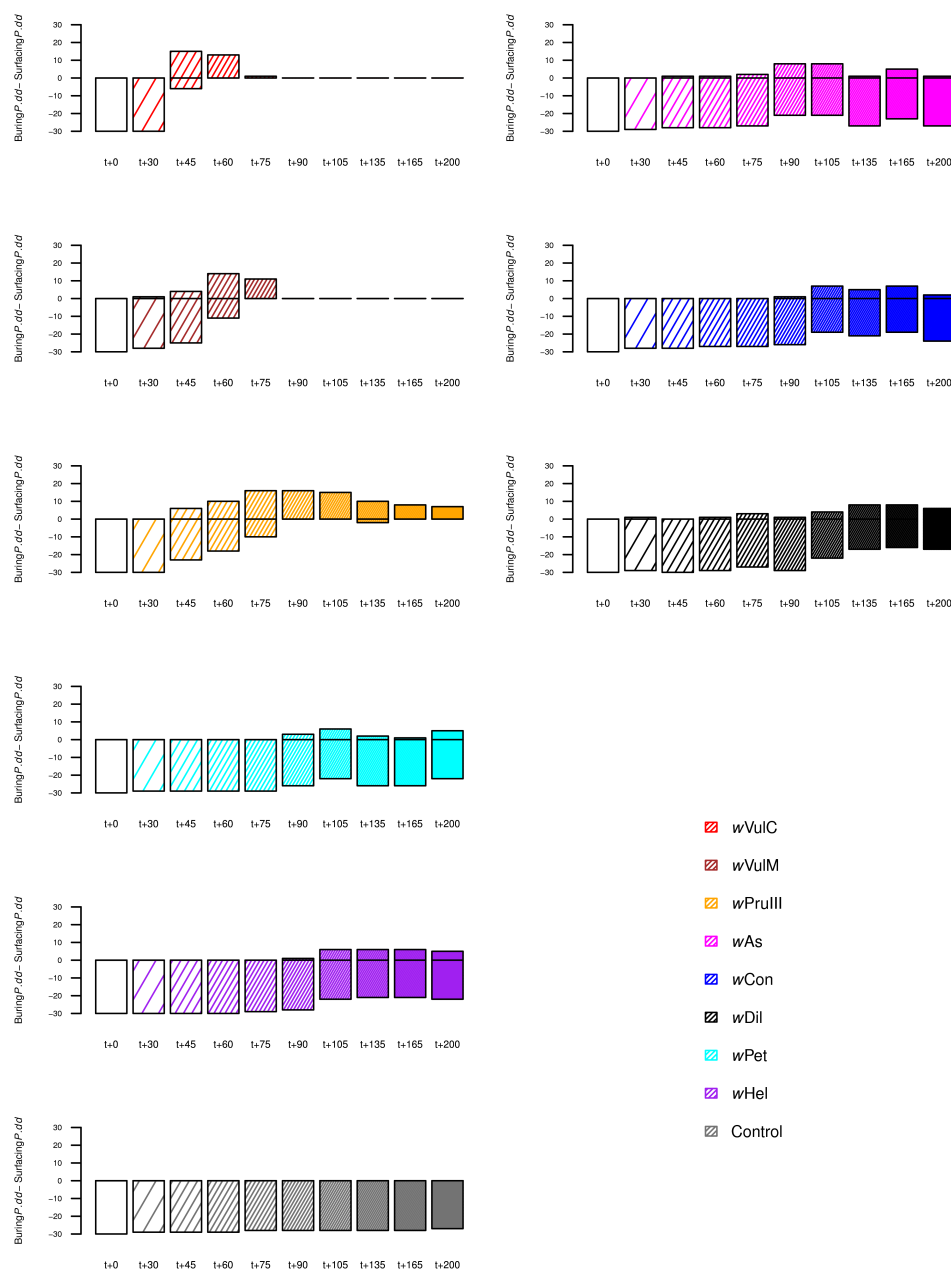


FIGURE III-3 – Variation in the number of *Porcellio d. dilatatus* buried or at the surface. Animals (females and males) were injected with all the *Wolbachia* strains described in Table III-1 or control treatment and followed for 200 days post-injection. The level 0 corresponds to the surface of the substrate; negative values correspond to the number of buried animals while positive values correspond to the number of animals found at the surface of the substrate. For animals of the control treatment, not a single individual rose to the surface, while all animals injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPrullI* were observed at the surface at 60 days, 75 days and 90 days post-injection, respectively. For individuals injected with the other *Wolbachia* strains, only few animals were spotted at the surface from 75 days.

injection, significant variation in survival was observed (Table III-3 ; Fig. III-4) but when data from individuals injected with *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* were removed from the dataset, significant differences between treatments were no longer detected. This shows that the other *Wolbachia* strains did not significantly impact the recipient host survival. The comparison between the effects of the three *Wolbachia* strains that actually killed *P. d. dilatatus* revealed heterogeneity in their pathogenicity : While the survival of injected individuals was between 80 % and 90 % in the control and the other *Wolbachia* transfection treatments, all individuals injected with *wVulC* died within 75 days (TL₅₀, the time required to decrease survival by 50 %, was of 60 days ; Table III-4 ; Fig. III-4), all individuals injected with *wVulM* died within 90 days (TL₅₀= 75 days ; Table III-4 ; Fig. III-4) and 78 % of individuals injected with *wPruIII* died during the 200 days of the experiment (TL₅₀= 105 days ; Table III-4 ; Fig. III-4). At 200 days, only individuals injected with *wPruIII* significantly differed in mortality compared to others (Table III-3). Since *P. d. dilatatus* needs at least 50 days to reproduce (from insemination to the releasing of the young from the marsupium), no vertical transmission (i.e., from transinfected mother to the progeny) could be possible after the injection of the pathogenic *Wolbachia* strains *wVulC* and *wVulM*. Some females injected with *wPruIII* were put together with males but all of them died before having given any progeny.

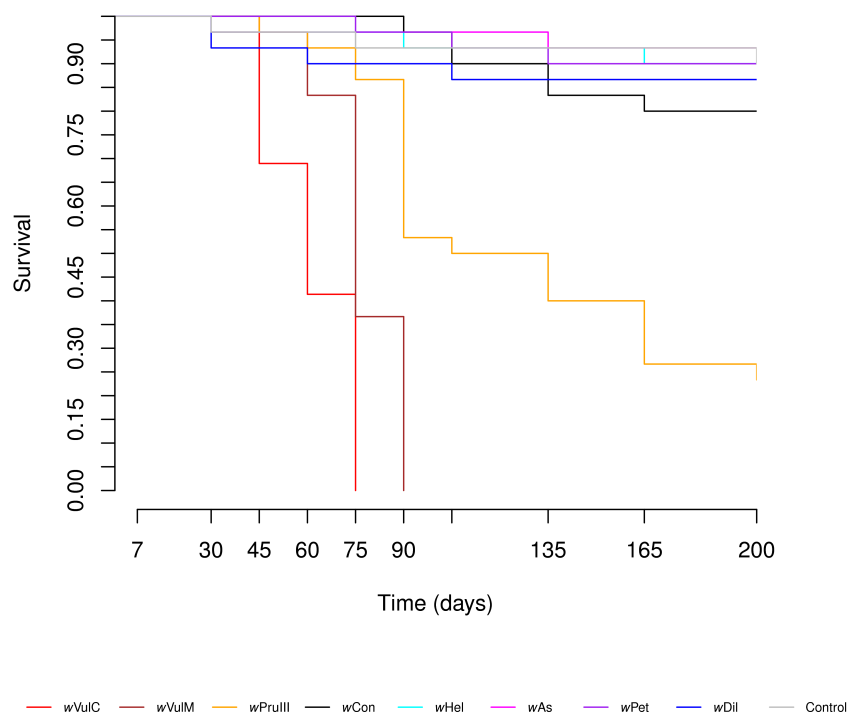


FIGURE III-4 – Survival curve plots of *Porcellio d. dilatatus* during 200 days post-injection. Animals (females and males) were injected with all the *Wolbachia* strains described in Table III-1 or control treatment. Measurements were taken during 200 days after injection. The injection of *wVulC* and *wVulM* kills all the individuals and injection of *wPruIII* induces 78 % of mortality at 200 days. For the other *Wolbachia* strains injected and control treatment, survival percentage is between 80 and 90 %.

1.3.2 Size and sex ratios in the F1 broods from mothers injected with *Wolbachia*

P. d. dilatatus females injected with “non-pathogenic” *Wolbachia* strains were crossed with asymbiotic males. These crossing experiments allowed us to test if horizontally transferred *Wolbachia* strains had found their way to the offsprings via vertical transmission and might potentially form a long-lasting interaction. The proportion of females with offspring was quite equivalent among treatments except for the females injected with *wDil* (native *Wolbachia* strain from another lineage of *P. d. dilatatus*), which gave only few broods in both replicates (Table III-2). The

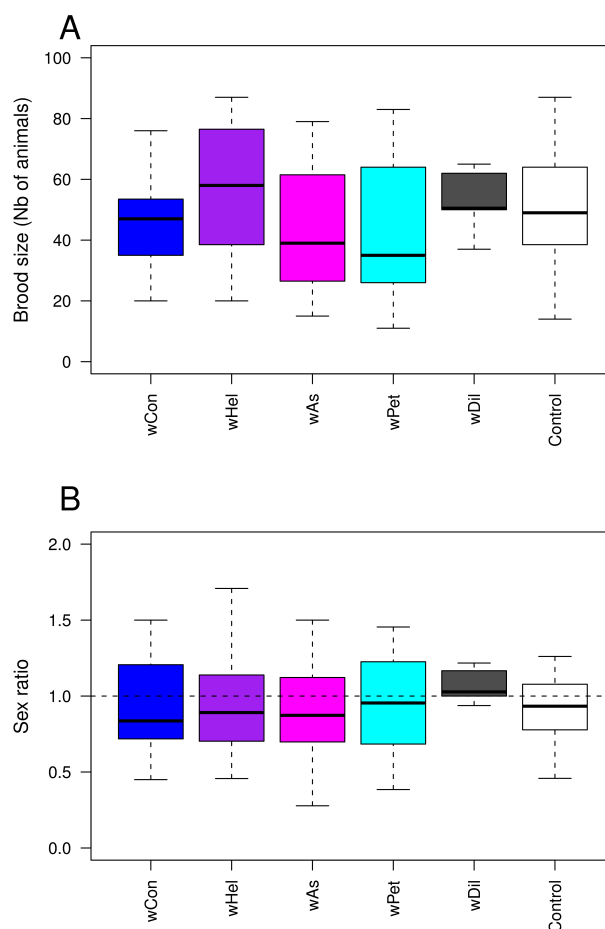


FIGURE III-5 – Size (A) and sex-ratio (B) of the brood from injected *P. d. dilatatus* mothers. Females injected with *wHel* *Wolbachia* strain released significantly more pulli (young woodlice) than the ones injected with *wAs* and *wPet*. Sex ratio did not exhibit any significant variation with any of the *Wolbachia* strains used.

comparison of the brood size between the different conditions revealed significant differences between (i) females injected with *wHel* and those injected with *wAs* (Welch *t*-test : $df=44.40$, $t=2.3214$, $p=0.0249$) and (ii) females injected with *wHel* and those injected with *wPet* (Welch *t*-test : $df=42.52$, $t=2.2260$, $p=0.0313$) (Fig. III-5 A). Indeed, broods from females injected with *wHel* were significantly larger than broods from females injected with *wAs* or *wPet*. The sex ratio of the progenies was close to equilibrium and similar in all treatments (Fig. III-5 B).

1.3.3 *Wolbachia* quantification in organs of native donor hosts, injected *P. d. dilatatus* and their F1 progenies

Wolbachia quantification in ovaries, nerve cords and hemocytes of (i) donor hosts belonging to different terrestrial isopod species (Table III-1), (ii) injected *P. d. dilatatus* mothers and (iii) F1 progenies from injected mothers lead to address three questions : (i) What are the distributions of the *Wolbachia* strains used for transfection in the main organs of their respective native host ? (ii) When horizontally transferred to the recipient host *P. d. dilatatus*, are all these *Wolbachia* strains able to colonize the same organs and if so, do they keep the same level of colonization in the recipient host organs ? (iii) If horizontal transfers lead to a persisting infection, are the *Wolbachia* able to navigate through progenies and to form new long-lasting symbioses ?

First, we showed that all the tested *Wolbachia* strains were found in the three investigated tissues of their native hosts even if colonisation levels were not the same in all species. After transfection, all the *Wolbachia* strains were still detected by qPCR in all tested tissues of *P. d. dilatatus* as it was the case in the native hosts, showing that they were able to persist in this new host. Three distinct situations were observed (Table III-5 ; Fig. III-6) : (i) for *wVulC* and *wCon* the densities of *Wolbachia* in all *P. d. dilatatus* organs were similar to those quantified in their respective native hosts, (ii) the densities measured in all tissues of the recipient host injected with *wVulM*, *wPruIII*, *wHel* and *wPet* were significantly lower than in their respective native hosts, (iii) for *wAs* and *wDil*, the densities in ovaries (Fig. III-6 A) were similar in both donor and recipient hosts whereas the densities in nerve cords (Fig. III-6 B) and hemocytes (Fig. III-6 C) were higher in the *P. d. dilatatus* recipient host than in their native hosts.

Quantification of *Wolbachia* in the offspring of the injected *P. d. dilatatus* females (i.e., F1) could only be performed when the recipient host survived the *Wolbachia* infection. Again, we found three distinct situations (Table III-5 ; Fig. III-6) ; (i) for

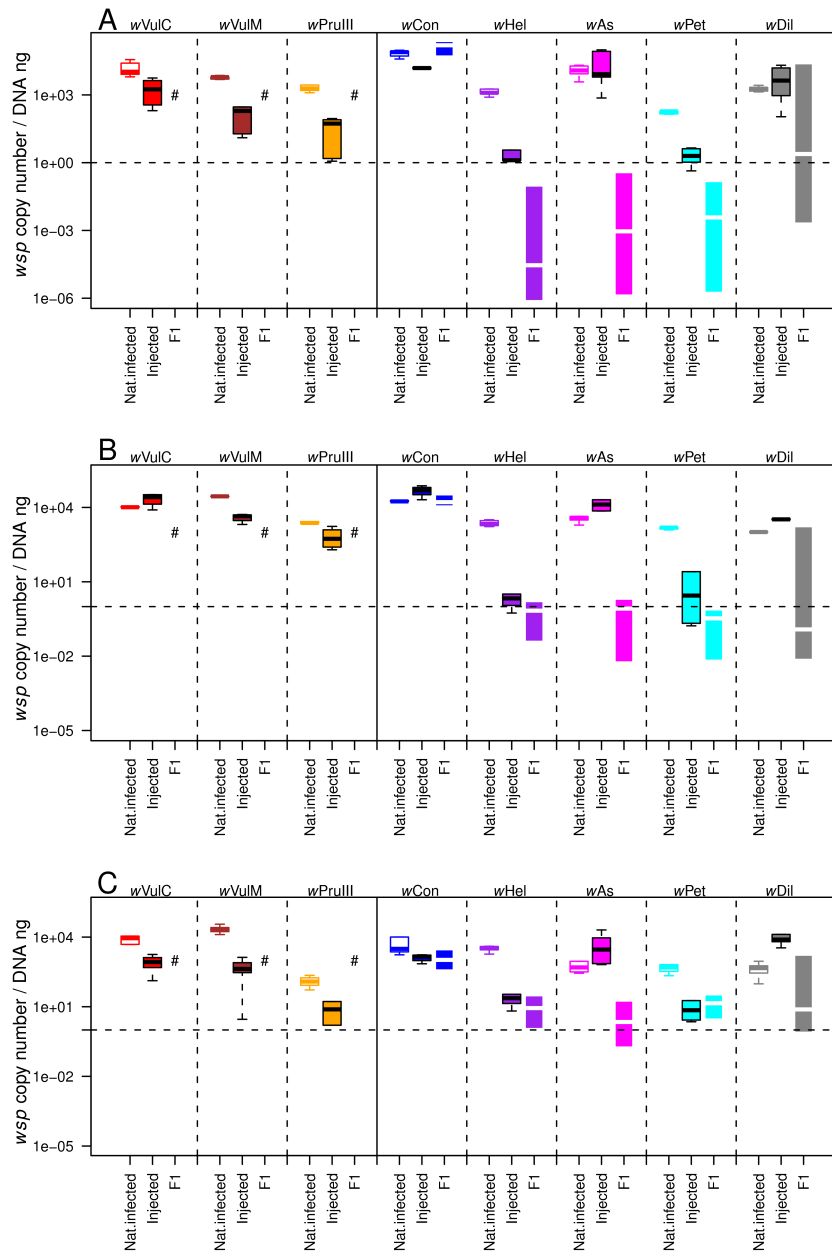


FIGURE III-6 – *Wolbachia* loads in ovaries (A), nerve cords (B) and hemocytes (C) of native hosts, injected *Porcellio d. dilatatus* females and their F1 progenies. Comparison between naturally infected hosts, injected *P. d. dilatatus* 200 days post-injection and F1 *P. d. dilatatus* offsprings from injected mothers revealed that *Wolbachia* colonizes all tissues of its hosts (natives or new ones). For wPet and wHel in injected animals, *Wolbachia* rates were very low and no vertical transmission occurred. Animals injected with wCon and wDil transmit their symbionts to their progenies but this was not the case for wAs, the only non-pathogenic feminizing strain used in this experiment. (# : no progenies was obtained because all injected females died before crossing experiments).

Tableau III-5 – Comparisons of *Wolbachia* densities between native donor hosts, injected *P. d. dilatatus* and F1 offsprings (animals from injected mother) in gonads, nervous tissues and hemocytes.

<i>Wolbachia</i> densities in gonads						
	Between native host / df	deviance	Injected host p	Between native host / df	F1 deviance	p
<i>w</i> VulC	7	w=10	0.1250	-	-	-
<i>w</i> VulM	9	w=30	0.0043	-	-	-
<i>w</i> PruIII	8	w=25	0.0079	-	-	-
<i>w</i> As	9	w=16	0.9307	72	w=312	0.0027
<i>w</i> Con	5	w=10	0.0952	61	w=83	0.1369
<i>w</i> Dil	9	w=13	0.7922	23	w=70	0.1917
<i>w</i> Pet	9	w=30	0.0043	69	w=330	0.0002
<i>w</i> Hel	8	w=25	0.0079	63	w=300	0.0002
<i>Wolbachia</i> densities in nervous tissue						
<i>w</i> VulC	7	w=5	0.2857	-	-	-
<i>w</i> VulM	9	w=30	0.0023	-	-	-
<i>w</i> PruIII	8	w=20	0.0158	-	-	-
<i>w</i> As	9	w=15	0.0401	72	w=317	0.0025
<i>w</i> Con	5	w=4	0.1905	61	w=174	0.4686
<i>w</i> Dil	9	w=30	0.0043	23	w=75	0.0956
<i>w</i> Pet	9	w=30	0.0043	69	w=335	0.0002
<i>w</i> Hel	8	w=25	0.0079	63	w=310	0.0002
<i>Wolbachia</i> densities in hemocytes						
<i>w</i> VulC	7	w=6	0.2500	-	-	-
<i>w</i> VulM	9	w=30	0.0043	-	-	-
<i>w</i> PruIII	8	w=24	0.0095	-	-	-
<i>w</i> As	9	w=6	0.1255	72	w=321	0.0025
<i>w</i> Con	5	w=10	0.1250	61	w=192	0.0628
<i>w</i> Dil	9	w=25	0.0079	23	w=70	0.1852
<i>w</i> Pet	9	w=30	0.0043	69	w=318	0.0004
<i>w</i> Hel	8	w=25	0.0079	63	w=289	0.0004

Tableau III-6 – Transmission rate of the different *Wolbachia* strains to *P. d. dilatatus* progenies.

	F1 Females	F1 Males
<i>w</i> As	87 %	80 %
<i>w</i> Con	100 %	100 %
<i>w</i> Dil	100 %	100 %
<i>w</i> Pet	80 %	82 %
<i>w</i> Hel	73 %	82 %

the strains *wCon* and *wDil*, which colonized the ovaries of recipient *P. d. dilatatus* mothers well (more than 10^3 *Wolbachia*/ng of total DNA), the vertical transmission of both strains from injected mothers to their offspring was clear even if quite variable in the offspring of females injected with the native strain *wDil* (Table III-6), (ii) for *wHel* and *wPet*, which showed low colonisation of the ovaries of the recipient *P. d. dilatatus* mothers (less than 10^1 *Wolbachia*/ng of total DNA), the vertical transmission was poor (Table III-6). The F1 progeny showed levels of colonisation even lower than those of their mothers (i.e., less than one *Wolbachia*/ng of total DNA), revealing a low probability to form a long-lasting symbiosis, (iii) for *wAs*, the only feminizing strain that did not kill the recipient host, the colonisation of gonads of the recipient mothers was extensive (around 10^4 *Wolbachia*/ng of total DNA) but the vertical transmission to progeny was poor since only few *Wolbachia* (less than 1 *Wolbachia*/ng of total DNA) were detected in the progeny, also suggesting that the symbiosis will not last at a long time scale.

1.4 Discussion

While the *Wolbachia* are fundamentally vertically transmitted from one generation to the next, it is increasingly recognized that horizontal transfers between individuals at both intra- and interspecific levels also play an important role in the evolutionary dynamics of these endosymbionts in arthropods (Kraaijeveld *et al.* 2011). In this study, we tested the ability of 8 different strains of *Wolbachia* [four feminizing strains (*wVulC*, *wVulM*, *wPruIII* and *wAs*) and three CI strains (*wDil*, *wPet*, *wCon*) and one whose effect is still unknown (*wHel*)] to jump from one host to another at both intra- and interspecific levels by assessing their capacity to (i) colonize the same recipient host *P. d. dilatatus* and (ii) to vertically transmit to the offspring and form new long-lasting symbioses. A dramatic increase in virulence due to horizontal transfer was recently described in the same model system by Le Clec'h *et al.* (2012) showing that the feminizing *Wolbachia* strain *wVulC* from *A.*

vulgare induced paralysis, growth slowdown and eventually death of the recipient host *P. d. dilatatus*. This high virulence of the feminizing *Wolbachia* *wVulC* in this recipient host was explained by an excessive autophagic reaction of the host against the symbiont, leading to host tissue destruction (Le Clec'h *et al.* 2012). Here, we demonstrate that *wVulC* is not the only *Wolbachia* strain that kills *P. d. dilatatus*. Indeed, *P. d. dilatatus* injected with *wVulM* [the second feminizing *Wolbachia* strain found in *A. vulgare* populations (Cordaux *et al.* 2004)] and *wPruIII* [a feminizing strain from *Porcellionides pruinosus* (Michel-Salzat *et al.* 2001)] exhibited similar symptoms : Paralysis, seizures, leg tremors, growth slowdown and surfacing behaviour observed prior to the death of the animals. Observation by electron microscopy of nerve cells in sick animals (infected with *wVulM* or *wPruIII*) revealed an abnormal number of autophagic vesicles, resulting in a disorganization of their cytoplasm as previously described for *wVulC* (Le Clec'h *et al.* 2012) (Supplementary data Fig. III-7). This suggests that these three feminizing *Wolbachia* strains also induce nervous system disorders caused by autophagy (Le Clec'h *et al.* 2012). Nevertheless, the appearance of the symptoms are clearly postponed for *wVulM* and even more for *wPruIII* compared to *wVulC*. The higher virulence of *wVulC* compared to *wVulM* in the recipient host *P. d. dilatatus* could be due to the difference in the amount of transfected bacterial cells since *wVulC* exhibits higher titers than *wVulM* in the ovaries of their native host *A. vulgare* that served to prepare inocula. However, statistical analyses did not reveal any effect of the injected dose : The higher virulence of *wVulC* compared to *wVulM* would thus mostly be dependent on difference in bacterial genotypes. Indeed, differences in virulence between *wVulC* and *wVulM* also exist in their native host *A. vulgare* where *wVulC* has been described as being more costly regarding several life-history traits than *wVulM* (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Lachat 2009). Differences in the feminization efficiency between the two strains have also been previously described, *wVulC* being a more efficient feminizer than *wVulM*, suggesting a potential link between the level of feminization

and the level of virulence in their common native host *A. vulgare* (Cordaux *et al.* 2004). Once tranfected to the host *P. d. dilatatus*, both *wVulC* and *wVulM*, which are quite divergent genetically but convergent in their feminizing phenotypes in *A. vulgare*, also converge in their pathogenic effects on the recipient host. The third pathogenic *Wolbachia* strain is *wPruIII* from *Porcellionides pruinosus*. This *Wolbachia* strain is genetically distant from both *wVulC* and *wVulM* (Cordaux *et al.* 2012) and comes from a native host that is distant from *A. vulgare* (Michel-Salzat *et al.* 2001). Therefore, the only obvious common feature between the three strains which kill *P. d. dilatatus* after horizontal transfer is their ability to feminize their native hosts.

The *Wolbachia* strains that did not kill *P. d. dilatatus* did not induce any measurable effect on *P. d. dilatatus*'s survival. All the transfected *Wolbachia* colonized the recipient host, underlying their great plasticity. Moreover, the *Wolbachia* are not only colonizing the gonads of the recipient host but also other organs not involved in vertical transmission : Colonization of nerve and immune tissues seems to be a common feature at least in terrestrial isopods. However, differences in bacterial loads were observed : Some strains multiplied more than others in both donor and recipient hosts and in all organs, while others always exhibited low titers. Regarding the five non-pathogenic *Wolbachia*, three exhibited high titer levels (i.e., the native strain *wDil* but also *wCon* and *wAs*) while two others, namely *wPet* and *wHel*, exhibited much lower titers. However, both *wHel* and *wPet* also exhibited quite low titers in their respective native hosts and only keep this pattern in their new hosts. On the whole, only the intraspecific transfection with *wDil* and two interspecific transfections with *wAs* and *wCon* exhibited high titers like those observed in their respective native hosts. A quite interesting case is the one of *wCon* that is the strain that multiplies the most in all tested organs without clear virulence towards the recipient host, showing that virulence and bacterial loads are not always connected to each other. The level of virulence of a *Wolbachia* in *P. d. dilatatus* certainly mostly

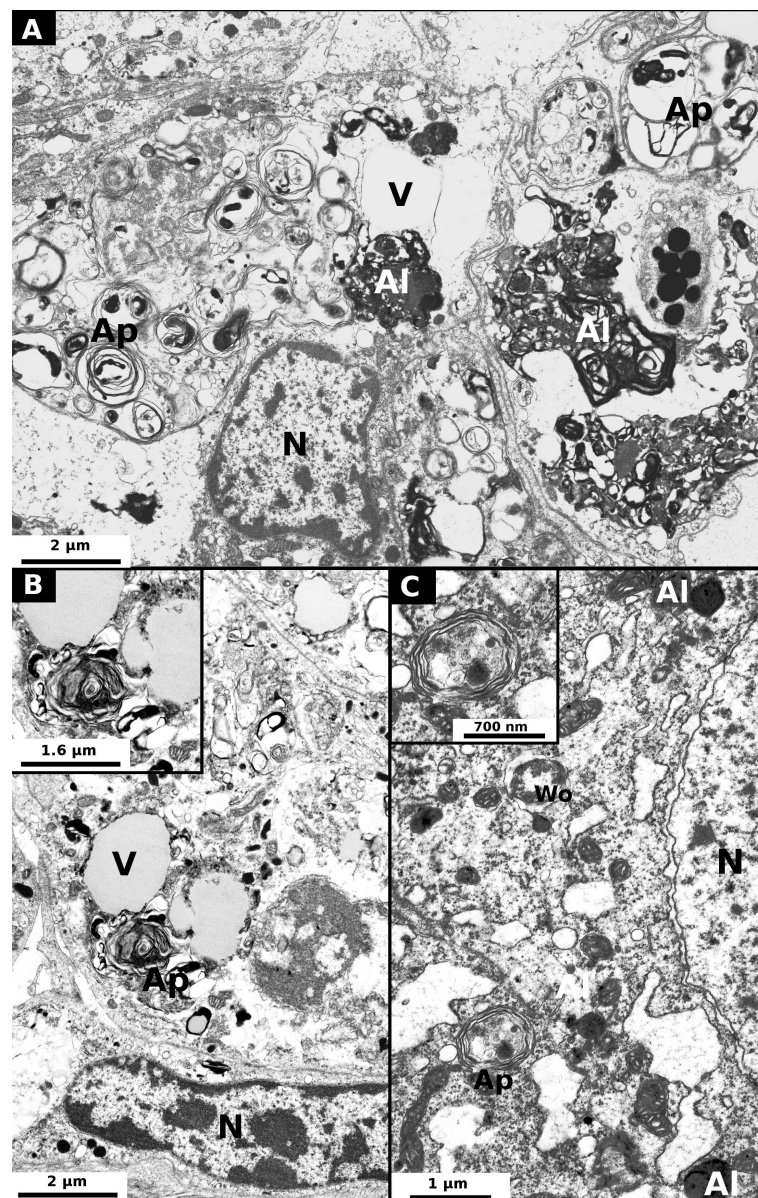


FIGURE III-7 – Supplementary data : Micrograph of nerve cells of *Porcellio d. dilatatus* injected by *wVulC*, *wVulM* and *wPruIII* at 60 days post-injection. These cells are localised in the nerve cord ganglion. (A) The nerve cells of animals injected with *wVulC* strain are filled of autophagic vesicles and are severely damage (N : Nucleus, V : Vacuole, Ap : Autophagosomes (Autophagic hallmark), Al : Autolysosomes). (B) The nerve cells of animals injected with *wVulM* exhibit some autophagic vesicles and began to be damage [N : Nucleus, V : Vacuole, Ap : Autophagosomes (Autophagic hallmark)]. (C) After the injection of *wPruIII*, few autophagic vesicles and some *Wolbachia* were visible (N : Nucleus, V : Vacuole, Ap : Autophagosomes (Autophagic hallmark), Al : Autolysosomes, Wo : *Wolbachia*)

relies (i) on differential expression of bacterial factors and (ii) on host reactions towards these factors. This statement is particularly well illustrated by the comparison between *wCon* and *wVulC* which are phylogenetically very close (Cordaux *et al.* 2012) and both exhibited similar high titers but differed in their virulence towards the recipient host *P. d. dilatatus*. This suggests a potential link between the difference in virulence for *P. d. dilatatus* and the kind of sex parasitism they are producing in their native host : *wCon* being a CI strain while *wVulC* induces feminization.

Vertical transmission to offspring can only occur for the *Wolbachia* that did not kill their recipient host. Among them *wAs*, *wCon* and *wDil* exhibited higher *Wolbachia* titers in ovaries of injected mothers than *wHel* and *wPet*. In accordance with titer levels recorded in ovaries of the mothers, the F1 offspring from females injected with low-titer bacterial strains exhibited low titers in all organs tested, suggesting that these strains were not likely to be maintained by vertical transmission through several generations. However, low-titer *Wolbachia* that were sustainably maintained through generations have already been described in some other hosts (Rigaud *et al.* 2001). The vertical transmission of high-titer *Wolbachia* from injected *P. d. dilatatus* females to their F1 offspring was only clearly efficient for the two CI strains *wCon* and *wDil*. Indeed, *wAs*, which also showed high titers in mothers, is poorly detected in F1 offspring. This means that no feminizing strain clearly passes to the next generation after transfection experiments in *P. d. dilatatus*. This observation could be explained in the light of the hypothesis of Rigaud *et al.* (2001) postulating that feminization would lead to a higher host specialization for a *Wolbachia* than CI. Thus, CI strains would be more prone to jump from one host to another than feminizing ones (Rigaud *et al.* 2001).

The two CI strains, *wDil* and *wCon* were undoubtedly vertically transferred to the next generation. However, the vertical transmission of *wDil* was not that efficient since a lot of females died during reproduction. We also showed that *wDil* had

a negative impact on the growth rate of *P. d. dilatatus*. As growth and sexual maturation are linked in many species including terrestrial isopods, this could explain both reductions in growth and in reproduction due to *wDil* (Sutton *et al.* 1984). Moreover, the vertical transmission of *wDil* was variable : Vertical transmission of this strain did not always occur at high titer (but in 100 % of progenies). On the contrary, the vertical transmission of *wCon* was very high. Hence, transfection of *wCon* could lead to the creation of stable infected lines of *P. d. dilatatus*. Such experimental horizontal transfers of *Wolbachia* between not closely related species have already been successfully performed between fly species or between flies and mosquitoes (Kang *et al.* 2003 ; Riegler *et al.* 2004 ; Xi *et al.* 2006). In our study, vertical transmission of *wCon* was efficient at least one generation after the horizontal transmission event. However, it is known that the vertical transmission after host switching is likely to be unstable over generations and that the symbiont can eventually be lost (Heath *et al.* 1999 ; Huigens *et al.* 2004 ; Pintureau *et al.* 2000 ; Van Meer & Stouthamer 1999).

Our study highlights the huge plasticity of *Wolbachia*, in terms of immediate ability to colonize a new host since we demonstrate that all the *Wolbachia* strains were able to colonize *P. d. dilatatus* tissues including immune and nerve cells. However, during colonization three feminizing *Wolbachia* strains induced a pathogenic effect while the other strains exhibited no clear virulence. All the non-pathogenic strains of *Wolbachia* were detected in the offspring of *P. d. dilatatus*, showing that they found their way to vertical transmission. However, some of them were found at very low titers while others were found at high titers suggesting that few horizontal transfers might lead to sustainable symbioses.

1.4.1 Acknowledgments

We thank all the technical staff of the UMR CNRS 7267. We also thank Dr. J. Bertaux for help designing the project, Dr. F.J. Richard for her assistance in the

establishment of the mobility test. Dr. F. Chevalier and Ms. J. Dittmer for comments on previous versions of the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ADaWOL ANR-09-JCJC-0109-01 coordinated by Dr M. Sicard). W. Le Clec'h was supported by a grant from Région Poitou-charentes.

2 Conclusion du Chapitre 1

Si les transferts horizontaux jouent un rôle fondamental dans la dynamique évolutive des *Wolbachia* (Kraaijeveld *et al.* 2011), ils peuvent également être à l'origine de profonds changements de leur virulence (Lipsitch *et al.* 1996). De tels cas ont été rencontrés chez le receveur *P. d. dilatatus* transinfecté avec les souches de *Wolbachia* *wVulC* (Le Clec'h *et al.* 2012), *wVulM* [toutes deux natives de l'hôte *A. vulgare* (Cordaux *et al.* 2004)] et *wPruIII* [infectant naturellement *Porcellionides pruinosus* (Michel-Salzat *et al.* 2001)]. Bien qu'elles partagent toutes le même phénotype étendu, c'est à dire la féminisation des mâles génétiques, ces trois souches de *Wolbachia* sont phylogénétiquement très distantes [(Cordaux *et al.* 2012), Figure I-3]. Inoculées au receveur *P. d. dilatatus*, les souches *wVulC*, *wVulM* et *wPruIII* induisent pourtant les mêmes symptômes même si les temps d'apparition de ces derniers diffèrent entre les souches. Ainsi, la souche *wVulC* est celle qui s'avère avoir le coût le plus important pour *P. d. dilatatus*, viennent ensuite les souches *wVulM* et enfin *wPruIII*, conclusions étayées par l'analyse des traits de vie et l'observation des cellules nerveuses des animaux infectés. Cette variation dans les effets des souches *wVulC* et *wVulM* est d'ailleurs également retrouvée chez *A. vulgare*. En effet, la souche *wVulC* possède un coût plus élevé en terme de réduction du taux d'hémocytes circulants et de la survie de son hôte natif comparée à celui induit par la souche *wVulM* (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Lachat 2009). Seule la souche féminisante *wAs* n'engendre aucun phénotype pathogène pour son receveur : cette absence de virulence pourrait s'expliquer si l'on considère qu'il existe non pas un seul type de féminisation, mais plusieurs. Ainsi, les *A. vulgare* infectés par les souches *wVulC* et *wVulM* sont tous de phénotype femelle tandis que les populations de *Porcellionides pruinosus* ou d'*Oniscus asellus* infectés respectivement par les souches *wPruIII* et *wAs* peuvent présenter des animaux de phénotype mâles porteurs de *Wolbachia*. Bien que la souche *wPruIII* induise également une pathogénie chez *P. d. dilatatus*, cette dernière est tout de même beaucoup moins forte que celle provoquée par les

souches *wVulC* et *wVulM*. Nous pouvons alors supposer qu'il existe un lien entre virulence et niveau de féminisation des hôtes natifs par ces souches de *Wolbachia*. Les autres souches de *Wolbachia* injectées chez le receveur *P. d. dilatatus* (trois souches induisant de l'IC : *wDil*, *wPet* et *wCon*, la souche féminisante *wAs* et la souche *wHel* de phénotype étendu inconnu) n'induisent pas de modifications majeures des traits d'histoire de vie du receveur même si elles sont capables de s'implanter et de se multiplier dans les tissus gonadiques, nerveux et immunitaires. Ces résultats mettent en évidence la très grande plasticité des souches de *Wolbachia* d'isopodes, mais également la grande similarité existante entre les taux de colonisation des tissus du receveur et ceux des tissus de leurs hôtes natifs respectifs. Les patrons de colonisation des tissus apparaissent donc majoritairement dépendants du symbiote plutôt que de l'hôte au sein duquel il se trouve. Parmi ces cinq souches, trois (i.e., *wDil*, *wCon*, *wAs*) sont retrouvées en forte quantité dans tous les tissus de *P. d. dilatatus* tandis que les deux autres (i.e., *wPet* et *wHel*) présentent des densités plus faibles que celles rencontrées chez leurs hôtes natifs. Si cette faible colonisation peut s'expliquer relativement bien pour *wHel*, dont l'hôte *Helleria brevicornis* est très éloigné phylogénétiquement de *P. d. dilatatus*, elle demeure inattendue pour *wPet* puisque *Porcellio dilatatus petiti* et *P. d. dilatatus* sont des sous espèces pouvant se croiser (Cordaux *et al.* 2012 ; Legrand & Juchault 1986). Parmi toutes ces souches injectées, le cas de *wCon* est remarquable : cette souche, très proche de *wVulC* mais induisant de l'IC chez son hôte natif, est présente dans les tissus du receveur à des densités similaires voire supérieures à celles observées avec *wVulC* ; toutefois, cette souche n'est absolument pas pathogène pour *P. d. dilatatus*. Ce résultat montre que le niveau de virulence de *Wolbachia* n'est pas majoritairement liée à la densité bactérienne présente dans les tissus (notamment le SNC) mais semble surtout dépendant du phénotype étendu originel de la souche. Ainsi, lors d'un transfert horizontal, le coût important pour le receveur des souches féminisantes comparé à celui dû aux souches induisant de l'IC pourrait être lié aux profondes modifications physiologiques

nécessaires à la féminisation des mâles lorsque ces souches sont transmises verticalement. La complexité du phénotype féminisant pourrait nécessiter des interactions plus étroites et intimes entre hôte et symbiote que l'IC. Les souches de *Wolbachia* induisant de l'IC semblent ainsi plus aptes aux transferts horizontaux et ceci pourrait contribuer à la plus grande répartition de ce phénotype sur une large échelle. En effet, l'IC se révèle être le phénotype étendu le plus ubiquiste chez les arthropodes et qualifié pour cela de phénotype ancestral par Rigaud & Rousset (1996) tandis que la féminisation n'est observée à l'heure actuelle que chez quelques espèces. Féminiser son hôte nécessite sûrement la sécrétion de facteurs féminisants au sein des cellules, peut être via les T4SS (Pichon *et al.* 2009). Ces facteurs de féminisation, interagissant habituellement spécifiquement avec les cellules de l'hôte natif, pourraient devenir des facteurs de virulence chez un receveur non adapté, menant alors au phénotype pathogène rencontré. Bien que toutes les souches de *Wolbachia* injectées soient présentes dans les tissus receveurs, seules deux souches induisant de l'IC, *wDil* et *wCon* montrent des densités importantes chez les descendants (F1) des femelles transinfectées. Cette transmission verticale réussie vient s'ajouter aux cas de transferts inter-spécifiques fructueux décrits chez des insectes montrant que les *Wolbachia* peuvent s'associer à de nouveaux partenaires (Riegler *et al.* 2004 ; Xi *et al.* 2006). Il faudra cependant vérifier sur plusieurs générations la stabilité de cette nouvelle symbiose puisque certaines études ont montré une diminution rapide de l'infection au cours des générations (Heath *et al.* 1999 ; Huigens *et al.* 2004 ; Pintureau *et al.* 2000 ; Van Meer & Stouthamer 1999).

Cette étude a démontré l'importante plasticité des souches de *Wolbachia* d'isopodes, capables de s'installer voire même, pour une petite partie d'entre elles, de se transmettre à la descendance des receveurs *P. d. dilatatus*. Néanmoins, si certaines associations peuvent conduire à la mise en place d'interactions durables, d'autres se révèlent caduques. Nous avons également constaté, après transfert hori-

zontal, que les fortes modifications de virulence concernent trois des quatres souches féminisantes injectées. L'effet pathogène rencontré chez le receveur pourrait donc être lié au phénotype féminisant, voire même à l'intensité de la féminisation rencontrée chez les hôtes natifs, que ce soit par l'intermédiaire de sécrétions de différentes molécules impliquées dans la féminisation se révélant directement toxiques pour le receveur non-coadapté et / ou par l'activation des processus autophagiques des cellules de ce dernier en réponse aux sécrétions du symbiote. Par ailleurs, la sécrétion de facteurs de féminisation de nature différentes pourraient expliquer en partie les variations de virulence entre les souches. Ainsi, l'impact de *wVulC* sur les traits d'histoire de vie de *P. d. dilatatus* est plus important que ceux induit par la souche *wVulM*. Cependant une question reste en suspens : Ces variations d'effet sur l'hôte receveur sont-elles liées au génotype de la souche ou bien à d'autres paramètres tels que la dose bactérienne injectée qui diffèrent jusqu'ici dans nos expériences ?

Chapitre 2

Existe-t'il une réelle différence de virulence entre *wVulC* et *wVulM* ?

1 Introduction

Dans le premier chapitre, trois souches de *Wolbachia* se sont révélées pathogènes suite à leur injection chez le receveur *P. d. dilatatus*. Parmi celles-ci, les souches féminisantes *wVulC* et *wVulM*, toutes deux natives du même hôte *A. vulgare* mais phylogénétiquement distantes (Cordaux *et al.* 2012) ont induit une mort rapide de tous les animaux injectés. Cependant, nous avons observé un décalage dans l'apparition des symptômes et la mortalité suggérant une différence de virulence entre les deux souches. Dans cette partie, nous avons testé de façon rigoureuse à partir d'injection de broyats d'ovaires : (i) la différence de virulence entre les souches *wVulC* et *wVulM* et (ii) l'influence de la dose injectée dans le déroulement de la maladie causée par ces deux souches. Par ailleurs, nos expériences de transferts horizontaux avaient toujours été, jusqu'ici, effectuées à partir de broyat d'ovaires (siège de la transmission verticale). Cependant, Rigaud *et al.* (1995) ont démontré une voie écologique permettant le transfert horizontal de *Wolbachia*, via l'hémolymphe, entre deux isopodes blessés. Pour mimer un tel transfert, nous avons inoculé de

l'hémolymph d'un individu infecté à un individu non infecté par *Wolbachia*. Nous avons pu ainsi répondre aux questions suivantes : les souches de *Wolbachia*, *wVulC* et *wVulM* provenant de l'hémolymph et inoculées à *P. d. dilatatus* présentent-elles les mêmes capacités de colonisation et entraînent-elles les mêmes perturbations chez les receveurs que celles issues des ovaires ?

Differential impacts of two *Wolbachia* strains on the same host after transinfection : strain or dose effects ?

Winka Le Clec'h, Maryline Raimond, Didier Bouchon, Mathieu Sicard

The α -proteobacteria *Wolbachia pipientis* are may be the most common and widespread symbionts in the animal world, infecting arthropods and nematods. Mainly vertically inherited, *Wolbachia* have evolved some host reproductive manipulations named cytoplasmic incompatibility, thelytokous parthenogenesis, *male killing* and feminization to enhance their spread in populations. These transmission route is predicted to favour symbionts with low virulence. On the contrary, horizontal transfers of *Wolbachia* from one host to another have been shown to possibly increase the symbiont virulence. This situation was previously described after the transinfection of two feminizing *Wolbachia* strains, *wVulC* and *wVulM*, from crushed ovaries of the woodlouse *Armadillidium vulgare* injected in the recipient host *Porcellio dilatatus dilatatus*. These two *Wolbachia* strains induced severe symptoms and eventually caused the death of *P. d. dilatatus*. However, the symptoms appeared sooner after the transinfection of *wVulC* than of *wVulM*. To know whether this difference was due to difference in the dose of infection or to difference in virulence between the two *Wolbachia* strains, we performed injection of *wVulC* and *wVulM* with controlled and gradual doses of injection. This way, we showed that the two strains differed intrinsically in their virulence against *P. d. dilatatus* but also that the dose of injection influenced the virulence of both *wVulC* and *wVulM*. Moreover, we showed that *wVulC* reached higher titers in the recipient host than *wVulM* suggesting a potential link between the bacterial titers and the levels of virulence. We also addressed the question of the impact of the source of the *Wolbachia* used for the transinfection and demonstrated that *Wolbachia* transinfected via hemolymph colonized quicker and accelerated the appearance of the symptoms compared to those introduced via a crushed ovaries suspension.

Key words : *Porcellio dilatatus dilatatus*, *Wolbachia*, horizontal transfers, virulence, dose effect

1.1 Introduction

The endosymbionts *Wolbachia pipientis* are α -proteobacteria infecting many arthropods (Hilgenboecker *et al.* 2008) in which they induce number of reproductive perturbations including cytoplasmic incompatibility (Serbus *et al.* 2008 ; Werren 1997), *male killing* (Jaenike 2007a), parthenogenesis (Huigens *et al.* 2000) and feminization (Bouchon *et al.* 2008). These reproductive alterations which enhance the vertical spread of *Wolbachia* into their host range constitute one side of

the symbiont virulence while in term of negative impact on life history traits, the *Wolbachia* generally exhibit weak virulence on their native hosts in accordance with predictions made for vertically transmitted symbionts (Engelstädter & Hurst 2009 ; Lipsitch *et al.* 1996).

However, strong reduction in host survivals due to *Wolbachia* have been reported in two distinct model systems. The most documented one involves the strain *wMelPop* and its native host *Drosophila melanogaster* (Min & Benzer 1997). This pathogenic strain while maternally inherited paradoxically induces a dramatic reduction of lifespan to its native host and several symptoms putatively due to the over-multiplication of the bacteria into cells of the host central nervous system (CNS) (Min & Benzer 1997). Recently, mortalities have been reported when the feminizing, but distantly related, *Wolbachia* strains *wVulC* and *wVulM* (Cordaux *et al.* 2012), coming from the woodlice species *Armadillidium vulgare*, have been transinfected into the woodlouse *Porcellio dilatatus dilatatus* [(Le Clec'h *et al.* 2012) ; Le Clec'h *et al. in review for publication in Evolution*]. These two strains of *Wolbachia* induce severe symptoms such as growth slowdown, paralysis and alteration of burying behaviour, prior to the death of all transinfected animals arising before any possible vertical transmission to progenies [(Le Clec'h *et al.* 2012) ; Le Clec'h *et al. in review for publication in Evolution*]. However, if both transinfection of *wVulC* and *wVulM* led to the death of all recipient hosts, the speed at which the death and the symptoms occur, considerably differs between the two strains : The host transinfected with *wVulC* died faster than those transinfected with *wVulM* (Le Clec'h *et al. in review for publication in Evolution*). One hypothesis explaining such difference would be the dose of injection because the titers of these two *Wolbachia* strains in the ovaries of their native host *A. vulgare* used as donor was on average 10 times higher for *wVulC* than for *wVulM* (Le Clec'h *et al. in review for publication in Evolution*). A second hypothesis would be that the two strains differ in virulence due to different replication rates and / or the production of distinct virulence factors. To address the

question of the cause of such a difference between the impact of the transinfection of wVulC and wVulM on *P. d. dilatatus*, we performed new transinfection experiments using dilution of ovaries suspension in order to inject controlled and gradual doses of *Wolbachia* into *P. d. dilatatus*. Secondly, we tested if both strains also exhibited a strong virulence in a more natural horizontal transmission way. For this purpose, asymbiotic *P. d. dilatatus* were transinfected with hemolymph of symbiotic animals harbouring either wVulC or wVulM strains. Transinfected animals with both methods were monitored for their gain of weight, their mobility, their burying behaviour and their survival. In parallel, wVulC and wVulM titers were assessed in ovaries, CNS (i.e., nerve cells and neighbouring adipocytes) and hemocytes by quantitative PCR.

Both phenotypic measurements and titer values demonstrated that the difference reported between the two pathogenic *Wolbachia* strains wVulC and wVulM are mainly due to difference in virulence rather than to the difference in the injected doses. However, gradual doses of injection affect in a different manner the life history traits of *P. d. dilatatus* showing that the time the symptoms appear is linked to the dose of injected *Wolbachia*. Moreover, we demonstrated that injection of hemolymph harbouring hemocytes infected by wVulC and wVulM induces similar symptoms and causes the death of *P. d. dilatatus* suggesting that mortality due to horizontal transfers of *Wolbachia* between hosts could occur in nature.

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Biological materials

All the animals were grown at 20°C in natural photoperiod, into plastic breeding boxes, on moistened potting mix derived from peat from sphagnum moss (pH = 6.4 and conductivity = 50.0 mS/m) and fed with dead lime-tree leaves ad libidum. The recipient hosts of all experiments were asymbiotic (i.e., without *Wolbachia*) *Porcellio dilatatus dilatatus* which were collected at Rom (France) and reared in controlled

line in the laboratory since 1988. As donors for both *Wolbachia* strains, we used *Armadillidium vulgare* individuals from (i) a controlled line infected by *wVulC*, originating from Helsingor (Denmark) in 1991 and (ii) a controlled line infected by *wVulM* originating from Mery sur Cher (France) in 1999. An asymbiotic line of *A. vulgare* originating from Helsingor (Denmark) in 1991 was used as control treatment.

1.2.2 Injections of *Wolbachia* from ovaries or hemolymph

Asymbiotic *P. d. dilatatus* females of 6-month-old were injected with one of the two *Wolbachia* strains, *wVulC* and *wVulM*, or with a control treatment. Two independent experiments were performed, with two different tissues as a source for the transinfection : ovaries or hemolymph. Suspensions of crushed ovaries were prepared by collecting ovaries from 5 donors (carrying the *Wolbachia wVulC*, *wVulM* or asymbiotic for control treatment) and by crushing them into 1 mL of Ringer solution. The resulting suspension was filtered through a 1.2 μm pore membrane (Millipore). Serial dilutions of the pure suspension of crushed ovaries were performed by adding filtered Ringer (CaCl_2 1.4 mM ; NaHCO_3 2.4 mM ; KCl 2 mM ; NaCl 0.4 M ; with adjusted osmolarity at 750 mOsm) in order to obtain the same bacterial dose of injection (i.e., with the same copies number of *Wolbachia* / injected μL) for both *Wolbachia* strains. The *Wolbachia* titer in each diluted inoculum was estimated by quantitative PCR (see below). The first dose of injection was $3.02 \times 10^3 \pm 2.06 \times 10^3$ *Wolbachia*/ μL for *wVulC* and of $3.69 \times 10^3 \pm 5.67 \times 10^2$ *Wolbachia*/ μL for *wVulM*, the second dose of injection was of $4.40 \times 10^2 \pm 1.82 \times 10^1$ *Wolbachia*/ μL for *wVulC* and of $3.32 \times 10^2 \pm 1.89 \times 10^2$ *Wolbachia*/ μL for *wVulM* and the third dose of injection was of $7.22 \times 10^1 \pm 2.80 \times 10^1$ *Wolbachia*/ μL for *wVulC* and of $9.41 \times 10^1 \pm 3.62 \times 10^1$ *Wolbachia*/ μL for *wVulM*. For each dose of injection and each treatment (*Wolbachia* strains or control), 10 recipient animals by replicate (5 for life traits and 5 for quantification) were injected with 1 μL of *Wolbachia* suspension injected through a small hole pierced in the cuticle, using a thin glass needle into the general cavity

at the posterior part of animals (Rigaud & Juchault 1995). For each treatment, 3 independent replicates of injections were performed. Animals that received the different treatments were then monitored for life history trait measurements during 120 days and for *Wolbachia* quantifications every 15 days during 75 days.

The other type of transinfection was performed by injecting hemolymph, carrying hemocytes infected by *Wolbachia* ($6.33 \times 10^3 \pm 3.20 \times 10^3$ *Wolbachia*/μL for *wVulC* and $6.39 \times 10^2 \pm 2.30 \times 10^2$ *Wolbachia*/μL for *wVulM*) in asymbiotic *P. d. dilatatus*. The cuticle of each of the five symbiotic *A. vulgare* females used as donors was pierced dorsally between the sixth and the seventh dorsal abdominal segments using a needle and 10 μL of hemolymph were collected with a micropipette and pooled into a microtube kept on ice, in order to limit coagulation of hemocytes. Control treatments were performed the same way starting from asymbiotic *A. vulgare* females as donors. Two microliters of hemolymph were then injected into the general cavity of 10 recipient individual per replicate (5 for life traits and 5 for quantification). For each treatment, 3 independent replicates of injections were performed. Transinfected females and controls were then monitored for life history traits during 120 days and a part of them were used for *Wolbachia* quantifications every 15 days during 75 days.

1.2.3 Life history traits measurements

For each condition some life history traits were recorded during 120 days post-injection (until the last individuals infected by *wVulM* died). The first measurement was performed at $t = 0$. The following measurements were then performed every 15 days until 75 days and thereafter the two last measurements were performed at 100 and 120 days post-injection. The gain of weight was calculated for each animal at each point by weighting them on a precision balance ($d = 0.001g$) and dividing the weight at the time $t = x$ by the weight at time $t = 0$. The mobility test was performed by measuring the moving time of each individual in a glass Petri dish onto a period of 3 minutes. The burying behavior was determined by the number of individuals

located at the surface versus the number of buried animals. The survival rate was measured by counting the number of live animals for each treatment.

1.2.4 Tissue samples and DNA extractions for *Wolbachia* quantifications

Total DNA was extracted from the gonads (i.e., ovaries), nerve cord (i.e., nerve cells and neighbouring adipocytes) and hemocytes of each tested individual as described by Kocher *et al.* (1989) after dissections. For each sample, the concentration and quality (ratios OD 260/280 nm and 260/230 nm) of the extracted DNA were measured using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo) and low quality DNA sample were removed.

1.2.5 Quantification of *Wolbachia* in host's tissues by quantitative PCR

The quantification of *Wolbachia*, was performed by quantitative PCR (qPCR) on DNA samples of ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes for each treatment and at the same time points than the life history trait measurements. *Wolbachia* quantification was also performed for all inocula in order to verify the dose of injection. All the qPCR reactions were realized with DNA sampled from gonads, nerve cords and hemocytes, using LightCycler 480 system (Roche) as follows : 10 min at 95°C, 45 times [10 sec at 95°C, 10 sec at 60°C, 20 sec at 72°C]. A melting curve (65°C to 97°C) was recorded at the end of each reaction in order to check the oneness of the PCR product. The reaction mixture consisted of 5 µL of SYBR-Green MasterMix (Roche), 0.5 µL of each 10 µM specific primers [wsp208f (5'-TGG-TGC-AGC-ATT-TAC-TCC-AG-3') and wsp413r (5'-TCG-CTT-GAT-AAG-CAA-AAC-CA-3')], which amplified 205 pb of the single-copy gene *wsp* (*Wolbachia* surface protein), 3 µL of sterile water and 1 µL of DNA (between 10 ng and 80 ng). Standard curve was plotted using 7 dilutions of *wsp* purified PCR product (*wsp* copies.µL⁻¹ : 2.63x10⁰, 2.63x10¹, 2.63x10², 2.63x10³, 2.63x10⁴, 2.63x10⁵, 2.63x10⁶, 2.63x10⁷). Number of the *wsp* copies was estimated by calculation in reference to

the standard curve. The total DNA quantity (i.e., host + *Wolbachia*) of each sample was used to normalize *wsp* gene copy number. The results are thus given in number of *wsp* copies by ng of total DNA. For each condition, two technical replicates were performed.

1.2.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 2.10.1). For the life-history traits, we first adjusted a model to our data which includes, dose (i.e., the number of injected *Wolbachia*), and treatments (control, injection of $wVulC$ or $wVulM$). We then re-adjusted the same model after removing the control treatment from the data set, which allowed a comparison between the effect of $wVulC$ and $wVulM$. As the experiments were performed on three independent groups of individuals, a randomized block effect has been taken into account in the models when possible. This last analysis showed that the inter-block variance was very low indicating that measures were repeatable between blocks. The gain of weight and the mobility were compared between treatments at 60 days post-injection with a Gaussian linear mixed-effects model with randomized block effect fit by maximum likelihood (ML) [`lme` function in `nlme` package (Lindstrom & Bates 1988)]. For the comparison of the animal location in the boxes between treatments through the whole experiment, a generalized linear model with binomial error and logit link function was performed. In these analyses, the data were collected from simultaneous observations of all the individuals from a same rearing box. As the comparison was made between groups of boxes and not between individuals, it was thus not necessary to add a random effect in the model. Survival curves were compared between treatments using a general mixed-effects Cox model with randomized block effect [`coxme` fonction in `kinship` package (Therneau *et al.* 2003)]. *Wolbachia* density in tissues were compared with a Wilcoxon test because data distribution did not followed a normal distribution.

Tableau III-7 – Global Effects of *wVulC* and *wVulM* on *P. d. dilatatus*'s life history traits injected at different doses with crushed ovaries suspension or hemolymph.

With different doses of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i>								With hemolymph injection of <i>wVulC</i> and <i>wVulM</i>					
	Factor	<i>df</i>	Between all the treatments at 60 days PI		<i>df</i>	Between all the strains 60 days PI without control		<i>df</i>	Between all the treatment at 45 days PI		<i>df</i>	Between all the strains 45 days PI without control	
			deviance	<i>p</i>		deviance	<i>p</i>		deviance	<i>p</i>		deviance	<i>p</i>
Gain of weight (lme)	Dose	5	10.7536	0.0354	4	12.5491	0.0254	1	0.1529	0.6956	1	0.1314	0.7169
	Treatment	6	19.6146	0.0032	5	17.5447	0.0035	2	7.6052	0.0223	1	5.5803	0.0325
	Residuals	24	0.0190	#	19	0.0192	#	12	0.0205	#	8	0.0221	#
Mobility (lme)	Dose	5	12.8762	0.0254	4	15.5486	0.0152	1	0.7713	0.3797	1	0.4404	0.5069
	Treatment	6	46.5563	<0.0001	5	37.6189	<0.0001	2	23.8550	<0.0001	1	12.0154	0.0005
	Residuals	24	18.3209	#	19	19.9131	#	12	14.8557	#	8	19.1049	#
Surface location (glm)	Dose	5	11.835	0.0005	4	5.1800	0.0228	1	0.2050	0.6510	1	0.1360	0.7520
	Treatment	6	52.391	<0.0001	5	15.187	0.0095	2	48.335	<0.0001	1	23.9251	<0.0001
	Residuals	126	53.959	#	106	56.6250	#	44	24.1470	#	36	25.3610	#
Survival (Cox Model)	Dose	5	3.4567	0.0487	4	4.3261	0.0471	1	0.6171	0.4320	1	0.8743	0.3497
	Treatment	6	74.4830	<0.0001	5	44.3564	<0.0001	2	20.1969	<0.0001	1	10.8647	0.0009
	Residuals	24	0.0014	#	19	0.0018	#	12	0.0014	#	8	0.0024	#

1.3 Results

1.3.1 Global alterations of *P. d. dilatatus* life history traits following transinfections

The global analysis including all the different treatments (i.e., control, $wVulC$ or $wVulM$ and transinfection with different doses of injection) using crushed ovaries suspension, showed for all life history traits [i.e., gain of weight (Figure III-8 A), activity (Figure III-7 B), burying behavior (Figure III-8 C to H) and survival (Figure III-8 I)] that the variances were significantly explained by both the type of injection (control, $wVulC$ or $wVulM$) and the dose of injection (Table III-7). After having removed the control treatment from the model, we still obtained significant differences showing that the variances were not only explained by differences between control treatment and *Wolbachia* transinfection treatments but also between $wVulC$ and $wVulM$ transinfections. The global analysis performed on data obtained for individuals injected with hemolymph showed for all the life history traits [(i.e., gain of weight (Figure III-9 A), activity (Figure III-9 B), burying behavior (Figure III-9 C) and survival (Figure III-9 D)] that the variances were only significantly explained by the type of injection (control, $wVulC$ or $wVulM$) but not by the dose of injection (Table III-7). Similar results were obtained after having removed the control from the dataset showing that the impacts of the two *Wolbachia* strains on *P. d. dilatatus* life history traits were different.

1.3.2 $wVulC$ causes stronger alterations than $wVulM$

Statistical comparisons between the effect of $wVulC$ and $wVulM$ at the same dose of injection were performed. Overall, $wVulC$ impacted more deeply life history traits than $wVulM$ (Table III-8 ; Figure III-8 A) : The activity parameter, TA_{50} (The Time Activity 50 corresponding to the time required to decrease mobility of 50 % from the initial one) was respectively of (i) 51 days for *P. d. dilatatus* injected with a dose of $\sim 10^3$ $wVulC/\mu L$ and 62 days for individuals injected with a similar dose of $wVulM$ (ii)

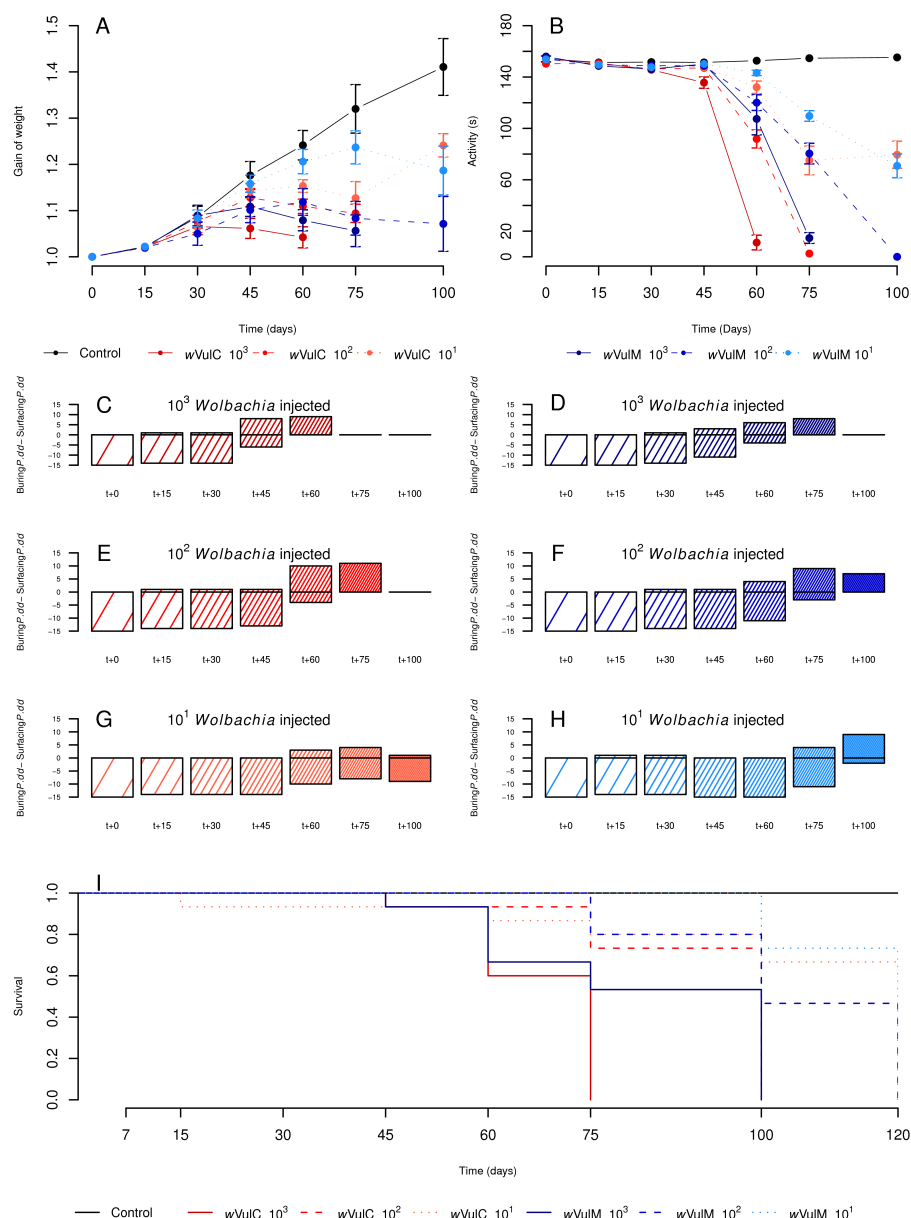


FIGURE III-8 – Effects of the two *Wolbachia* strains *wVulC* and *wVulM*, injected at gradual doses, on the *P. d. dilatatus*'s life history traits. (A) The weight gain was more impacted by *wVulC* than *wVulM* strains for the same doses injected. A “dose effect” existed even if the “strain effect” seemed to have more impact on this life history trait. (B) Similar observations for the mobility. (C, E, G) Surfacing behaviour of *P. d. dilatatus* injected with gradual doses of the *wVulC* strain (D, F, H) and of the *wVulM* strain. The level 0 corresponds to the surface of the substrate, negative values correspond of the number of buried animals while positive values correspond to the number of animals at the surface of the substrate. The surfacing behaviour of injected *P. d. dilatatus* was highly modified by the two strains but the *wVulC* strain had a stronger impact. Similar doses effects were shown after the injection of these two strain. (I) Survival of injected *P. d. dilatatus* was much stronger impacted by the *wVulC* strain compared to *wVulM*. Similar gradual impact, showing a dose effect, was also highlighted here. All animals died after the injection of all doses for both strains, even if the number of *Wolbachia* injected was very low.

Tableau III-8 – Comparison between the effect of $wVulC$ and $wVulM$ on *P. d. dilatatus*'s life history traits at 60 days PI when they are injected at the same doses.

	VulC 10^3 / VulM 10^3			VulC 10^2 / VulM 10^2			VulC 10^1 / VulM 10^1		
	<i>df</i>	deviance	<i>p</i>	<i>df</i>	deviance	<i>p</i>	<i>df</i>	deviance	<i>p</i>
Gain of weight	1	9.0224	0.0026	1	1.6218	0.2028	1	5.0519	0.0245
Mobility	1	8.8903	0.0028	1	10.0206	0.0015	1	5.6889	0.0170
Surface location	1	5.6898	0.0456	1	9.4466	0.0021	1	4.7454	0.0293
Survival	1	6.5034	0.0107	1	6.5810	0.0103	1	7.5100	0.0061

60 days for animals injected with $\sim 10^2$ $wVulC/\mu L$ and 70 days for animals injected with a similar dose of $wVulM$ (iii) 75 days after the injection of $\sim 10^1$ of $wVulC/\mu L$ and 81 days after the injection of a similar dose of $wVulM$ (Figure III-8 B). The burying behaviour represented by the TS_{100} (The time surface 100 corresponding to the time when all animals are spotted at the surface) was respectively of (i) 60 days for $wVulC$ versus 75 days for $wVulM$ for an initial dose of $\sim 10^3$ *Wolbachia*/ μL (ii) and 75 days for $wVulC$ versus 100 days for $wVulM$ strain for a dose of $\sim 10^2$ *Wolbachia*/ μL (Figure III-8 C to H), for a dose of $\sim 10^1$ of *Wolbachia*/ μL the TS_{100} was not possible to calculate since not all the animals raised at the surface before dying. For the survival of animals, the TL_{50} (corresponding to the time required to decrease survival at 50 %) was (i) 75 days for $wVulC$ strain and 100 days for $wVulM$ strain for an initial dose of injection of $\sim 10^3$ *Wolbachia*/ μL (ii) 100 days for $wVulC$ and 120 days $wVulM$ strains, for an initial dose of $\sim 10^2$ *Wolbachia*/ μL (iii) 120 days for both *Wolbachia* strains when they were injected at the dose of $\sim 10^1$ *Wolbachia*/ μL (Figure III-8 I). These results demonstrate that animals injected with the $wVulC$ strain suffered sooner of the symptoms (i.e., asthenia, seizures, leg tremors and paralysis), rose up earlier to the surface the substrate (Le Clec'h *et al.* 2012) and finally died quicker than animals injected with the $wVulM$ strain. This demonstrates that starting with the a same dose of injection, $wVulC$ caused stronger alterations of the recipient host life-history traits than $wVulM$.

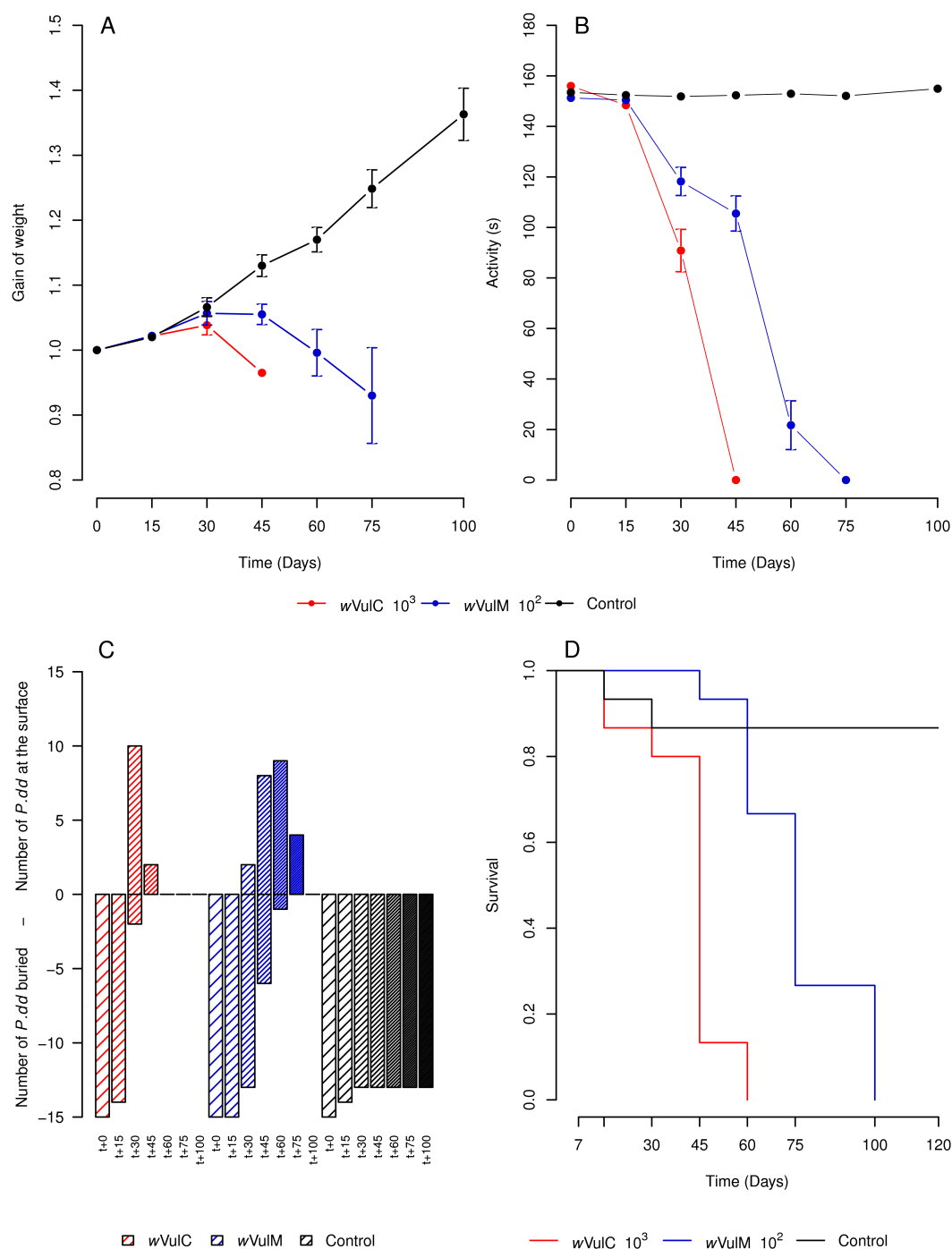


FIGURE III-9 – Effects of the two *Wolbachia* strains *wVulC* and *wVulM*, injected with infected hemolymph, on the *P. d. dilatatus*'s life history traits. Animals were injected by two pathogenic *Wolbachia* strains (i.e., *wVulC* or *wVulM*) and by a control from uninfected hemolymph. (A) The gain of weight was strongly impacted by the injection of the *wVulC* strain. (B) Similar results were obtained for the mobility of animals. (C) The surfacing behaviour was also strongly impacted by the both strain, particularly by *wVulC* while with the control, no animals rose up to the surface. (D) Survival was highly altered after the injection of both strain but much more with *wVulC*.

Tableau III-9 – Impact of different injected doses of $wVulC$ and $wVulM$ on *P. d. dilatatus*'s life history traits at 60 days PI.

	VulC 10 ³ / VulC 10 ² / VulC 10 ¹			VulM 10 ³ / VulM 10 ² / VulM 10 ¹		
	<i>df</i>	deviance	<i>p</i>	<i>df</i>	deviance	<i>p</i>
Gain of weight	2	10.7368	0.0046	2	28.7153	<0.0001
Mobility	2	28.9070	<0.0001	2	8.3972	0.0150
Surface location	2	10.8069	0.0010	2	25.3174	<0.0001
Survival	2	20.1910	<0.0001	2	6.4531	0.0037

1.3.3 A dose effect for both *Wolbachia* strains

Statistical comparisons between the different doses of infection, using ovaries as a source of *Wolbachia*, were performed for each strain of *Wolbachia* independently. This showed that, additionally to the difference in virulence between the two strains of *Wolbachia*, an important part of the variances was explained by an effect of the dose of injection : Higher doses of injection induced quicker and stronger impacts on all life history traits than lower ones (Table III-9).

1.3.4 Impact of the source of *Wolbachia* : hemolymph versus crushed ovaries

The impact of the two strains on the mobility of *P. d. dilatatus* infected with similar doses of *Wolbachia* also showed difference depending on the sources of infection (i.e., ovaries versus hemolymph). Overall, the injection of hemolymph induced quicker effects : (i) for $wVulC$ the TA_{50} was 30 days after hemolymph injection versus 51 days after crushed ovaries injection and for $wVulM$: 49 days after hemolymph injection versus 70 days after crushed ovaries injection (Figure III-8 B, III-9 B), (ii) for both *Wolbachia* strains the TS_{50} was recorded 15 days earlier after hemolymph injection than after crushed ovaries injection (Figure III-8 C to H and figure III-9 C), and (iii) For $wVulC$, the TL_{50} was recorded 30 days earlier and for $wVulM$ 25 days earlier after hemolymph injection compared to crushed ovaries injection (Figure

Tableau III-10 – Comparison of the *Wolbachia* densities into ovaries, CNS and hemocytes after injection of *wVulC* and *wVulM* from crushed ovaries at 60 days post-injection.

	VulC 10 ³ / VulM 10 ³	VulC 10 ² / VulM 10 ²	VulC 10 ¹ / VulM 10 ¹
Ovaries	W= 102 ; <i>df</i> = 27 ; <i>p</i> = 0.0006	W= 93 ; <i>df</i> = 28 ; <i>p</i> = 0.0498	W= 95 ; <i>df</i> = 28 ; <i>p</i> = 0.0479
CNS	W= 103 ; <i>df</i> = 27 ; <i>p</i> = 0.0003	W= 98 ; <i>df</i> = 28 ; <i>p</i> = 0.0301	W= 94 ; <i>df</i> = 28 ; <i>p</i> = 0.0489
Hemocytes	W= 104 ; <i>df</i> = 27 ; <i>p</i> = 0.0002	W= 92 ; <i>df</i> = 27 ; <i>p</i> = 0.0499	W= 97 ; <i>df</i> = 27 ; <i>p</i> = 0.0352

III-8 I ; Figure III-9 D). The gain of weight was also impacted differently depending on the source of infection. After hemolymph injection, animals infected with *wVulC* rapidly lose weight exhibiting a negative growth rate (gain of weight at 45 days PI : 0.9650 ± 0.0050) while animals injected with *wVulM* did not lose weight but only exhibited a growth slowdown compared to control individuals (gain of weight at 45 days PI : 1.0550 ± 0.0155 for animals injected with *wVulM* and 1.1300 ± 0.0165 for control animals). After injection of crushed ovary suspensions the growth rate never exhibited negative values, the gains of weight were low but the animals never lose weight (gain of weight at 45 days were 1.0614 ± 0.0216 for animals injected with *wVulC* ; 1.1013 ± 0.0273 for animals injected with *wVulM* and 1.1760 ± 0.0299 for control animals ; Figure III-8 A, III-9 A).

1.3.5 *Wolbachia* quantification in the ovaries, CNS and hemocytes

Wolbachia quantifications were performed for each time point on three biological replicates and three different tissues (i.e., ovaries, CNS and hemocytes). The global analysis between the quantities of *Wolbachia* measured in individuals infected by *wVulC* and those infected by *wVulM* in all tested tissues showed that in all comparable situations *wVulC* always colonized and multiplied at higher rates than *wVulM* (Table III-10 ; Figure III-10 and III-11). When we compared the *Wolbachia* quantities into the different tissues after injection of gradual initial doses from crushed ovaries of animals harboring *wVulC* or *wVulM*, no differences were observed at any time point showing that the initial doses did not affect the dynamics of *Wolbachia*

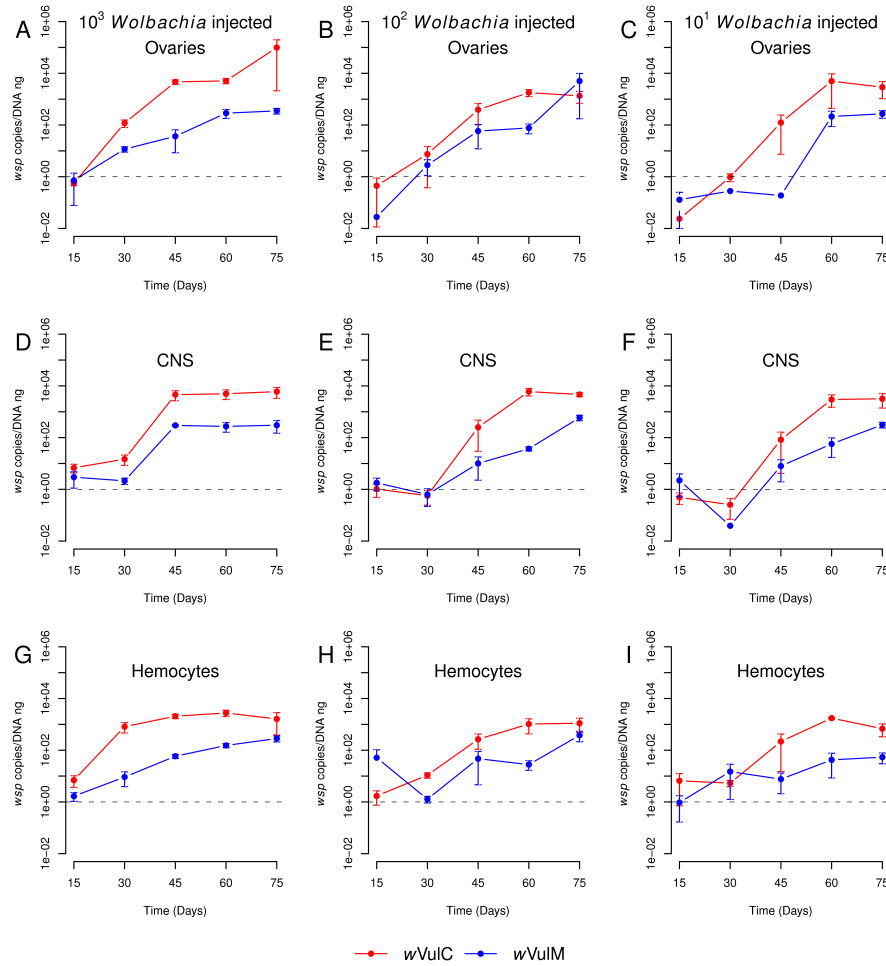


FIGURE III-10 – Comparison of the *Wolbachia* load into ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes for each strain and doses injected from crushed ovaries. Comparison between the load of the two strains, *wVulC* and *wVulM*, at the same dilution showed the *wVulC* strain had a higher replication rate than the *wVulM* strain in ovaries (A, B, C), CNS (D, E, F) and hemocytes (G, H, I). For the same strain but with different doses injected, no differences were found at 15 days post-injection and at 75 days post-injection. Whatever the dose injected for all the tissues, the strains were found at the same rate : the only difference was between the strains injected and not between the doses.

Tableau III-11 – Comparison of the *Wolbachia* densities into *P. d. dilatatus*' ovaries, CNS and hemocytes after injection of *wVulC* and *wVulM* from hemolymph at 30 days post-injection.

	VulC hemolymph 10^3 / VulC 10^3	VulM hemolymph 10^2 / VulM 10^2
Ovaries	W= 28 ; df = 19 ; p = 0.0156	W= 70 ; df = 26 ; p = 0.0942
CNS	W= 21 ; df = 19 ; p = 0.2969	W= 82 ; df = 26 ; p = 0.0080
Hemocytes	W= 21 ; df = 19 ; p = 0.0312	W= 57 ; df = 26 ; p = 0.4548

between 15 and 75 days PI. However, some difference could have occurred before the first point recorded. On the opposite, the infection source is playing an important role since the statistical analyses pointed out that the *Wolbachia* (either *wVulC* or *wVulM*) brought with hemolymph exhibited higher densities at the same dose injected and a same time point than those brought by crushed ovaries injections (Table III-11; Figure III-11).

1.4 Discussion

Wolbachia are often described as low virulent symbionts for their hosts (Engelstädter & Hurst 2009). This low virulence can be explained by the evolutionary consequences of vertical transmission that theoretically leads to the attenuation of symbiont virulence through a co-evolutionary process with its host (Bonds 2006). An exception to this rule is the case of the maternally inherited *wMelPop* strain which induces a strong virulent phenotype in *Drosophila* (Min & Benzer 1997). Horizontal transfers are also playing a role in *Wolbachia* dispersal and in such event the virulence of *Wolbachia* can possibly differs from that expressed in its native host due to a lack of host / symbiont co-adaptation (Lipsitch *et al.* 1996). According to these predictions, Le Clec'h *et al.* (2012) recently showed that the horizontal transfers of two feminizing *Wolbachia* strains (i.e., *wVulC* and *wVulM*) weakly virulent in their native host became pathogens when they are transferred into *P. d. dilatatus* (Le Clec'h *et al. in review for publication in Evolution*). Moreover, they showed

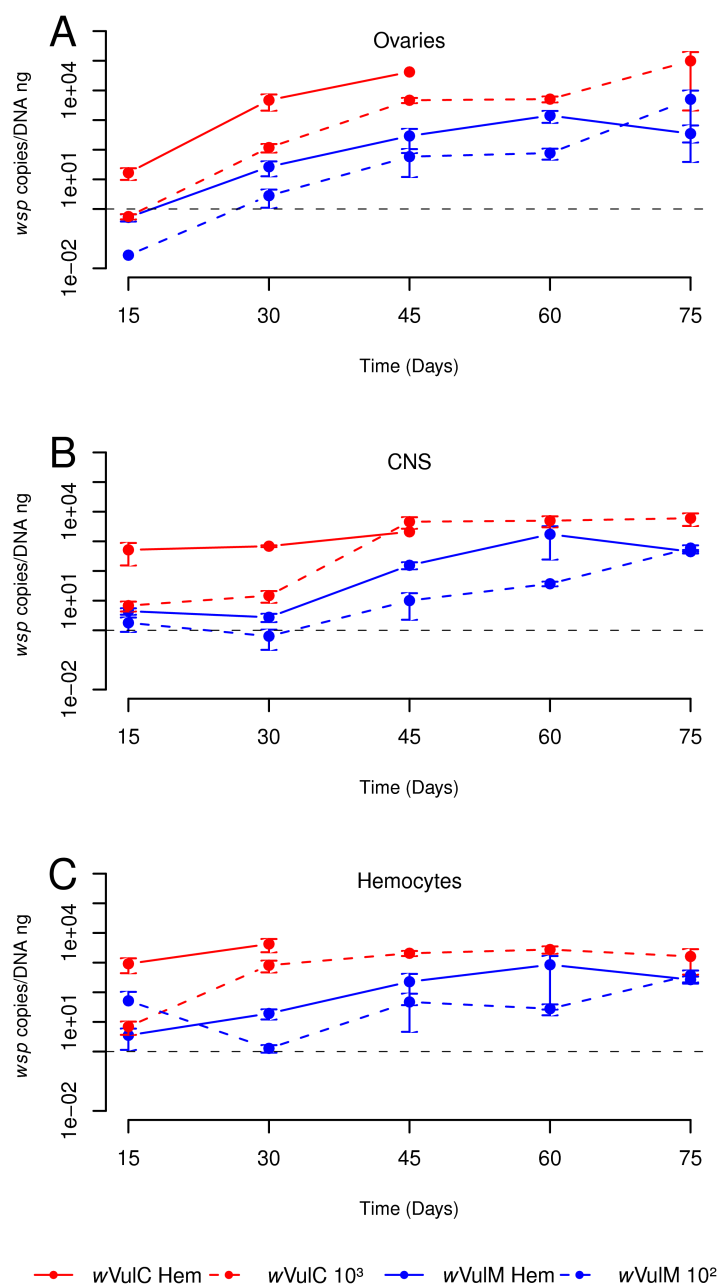


FIGURE III-11 – Comparison of the *Wolbachia* load into ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes for each strain injected at the same dose from hemolymph and from crushed ovaries. The *wVulC* strain from hemolymph had a higher replication rate than the same strain and at the same dose injected from crushed ovaries in ovaries and hemocytes. The replication rate of *wVulM* strain from hemolymph was higher in CNS than those of the same strain at the same dose injected from crushed ovaries.

differential effects after transinfection with these two strains of *Wolbachia* : Transinfections of *wVulC* strain inducing quicker and stronger effects than the ones with *wVulM* (Le Clec'h *et al. in review for publication in Evolution*). However, according to the titers of each *Wolbachia* strain in the ovaries of donors, in the previous study the doses of infection for the horizontal transfers were not similar : *wVulC* density being ten times higher than *wVulM* in ovaries of the donors. The present study sought to understand, on the one hand, if the difference in the consequences of the injection of the two *Wolbachia* strains (i.e., *wVulC* or *wVulM*) differed because of differences in the injected doses or because of differences in intrinsic virulence and, on the other hand, if the source of transfers (i.e., hemolymph or ovaries) would lead to differences in virulence.

Our results show that the virulence towards *P. d. dilatatus* undoubtedly differed intrinsically between *wVulC* and *wVulM* : The virulence of *wVulC* being clearly stronger than the one of *wVulM*. This is true whatever the dose of injection and for all the life history traits measured (i.e., the grain of weight, the mobility, the burying behaviour and the survival). The quantification of *Wolbachia* into three host tissues (i.e., ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes) showed that the higher virulence of *wVulC* might be linked to a higher multiplication and higher titers reached in *P. d. dilatatus* as, starting from a similar dose of injection, *wVulC* colonized the sampled tissues in the recipient at higher rates than *wVulM*. These results are in accordance with the hypotheses formulated by Cordaux *et al.* (2004) who studied the natural distribution of *wVulC* and *wVulM* in *Armadillidium vulgare*'s populations. Indeed, they suggested that *wVulC* could be considered as an invasive strain having a higher transmission efficiency than *wVulM* which could be thus considered as a resident strain. In such an evolutionary scenario, *wVulC* could invade host populations already infected by *wVulM* strain and outcompete the latter. A higher replication rate for *wVulC* compared to *wVulM* would be therefore coherent with the stronger virulence of *wVulC* already described in their native host

A. vulgare (Braquart-Varnier *et al.* 2008) but also in the foreign one *P. d. dilatatus* as observed in the present study. One major factor that could explain difference in virulence between the two strains towards *P. d. dilatatus* is thus the titers they reach. However, we cannot exclude that these differences in virulence might be also linked to divergence in effectors between wVulC and wVulM. Such divergence is quite probable considering that they are quite phylogenetically distant.

In addition, we demonstrated here that the virulence of the two *Wolbachia* strains towards *P. d. dilatatus* was positively correlated with the initial dose of injection. Such positive correlation between virulence towards the host and the number of inoculated bacteria was already demonstrated in several studies including the interactions between oysters (*Crassostrea gigas* and *Ostrea Edulis*) and *Vibrio sp.* (Jeffries 1982) and calves infected by *Pasteurella hemolytica* (Yates *et al.* 1983). In our study, the dose effect for a given *Wolbachia* strain had an impact on the life history traits of the recipient host but not on the density of *Wolbachia* in organs. For each injected strain, whatever the initial dose, the number of *Wolbachia* by ng of DNA was not different between 15 and 75 days post-injection. Even starting with low doses of infection, each *Wolbachia* strain always reached the same titers after 15 days post-injection. However, low doses of injection clearly postponed the appearance of the symptoms and death. This suggests that the delay observed in the symptoms and mortality with low injection doses would be linked to the first step of infection (i.e., before 15 days). This might be related to the host reaction by autophagy as described in Le Clec'h *et al.* (2012) which could be triggered later when initial injected dose was low. When *P. d. dilatatus* were transinfected via injection of hemolymph, the impacts of wVulC or wVulM were stronger than after the injection of crushed ovaries for the same bacterial dose. In the latter case, the appearance of symptoms such as lack of mobility, seizures, leg tremors, paralysis and surfacing behavior were always postponed. The stronger virulence observed when hemocytes are used to initiate the infection might be linked to difference in bacterial dynamics.

Starting from similar dose of injection, infection initiated with hemocytes exhibited higher titers than those initiated with crushed ovaries. This difference in the dynamics of the *Wolbachia* between injections made with crushed ovaries and those made with hemocytes might be due to the fact that in the first case cells are crushed and the suspension filtered : These manipulations can be stressful for the *Wolbachia* that have to survive in an extracellular manner. Thus the number of *Wolbachia* quantified into an inoculum of crushed ovaries could be higher than the actual number of viable *Wolbachia* potentially able to colonize a new host. Such bottleneck would be no so drastic when animals were infected with hemolymph. Indeed, the *Wolbachia* are localized within hemocytes and thus stay protected into cells during the experimental horizontal transfer (Chevalier *et al.* 2011). This difference between the localization (i.e., free in the solution or packaged into the hemocytes) and the treatment (i.e., crushed then filtered or directly injected) could explain the higher infectivity of *Wolbachia* brought within the hemocytes than those from crushed ovaries, even if the quantified injected doses were similar. Moreover, the hemocytes might act as vectors carrying the *Wolbachia* in some cells (e.g., nerve cells) that are not accessible for the extracellular *Wolbachia*.

1.4.1 Acknowledgments

We thank all the technical staff of the UMR CNRS 7267. We also thank Dr. J. Bertaux for help designing the project, Dr. F.J. Richard for her assistance in the establishment of the mobility test. Dr. F. Chevalier for comments on previous versions of the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ADaWOL ANR-09-JCJC-0109-01 coordinated by Dr M. Sicard). W. Le Clec'h was supported by a grant from Région Poitou-charentes.

2 Conclusion du Chapitre 2

Lors de transferts horizontaux chez *P. d. dilatatus*, les souches de *Wolbachia* féminisantes se sont révélées être plus virulentes que celles induisant de l'IC (LeClec'h *et al.*, *in review pour publication dans Evolution*). Il existe cependant des variations au sein même du caractère pathogène de ces souches. Ainsi, la souche wVulC s'avère plus pathogène pour son receveur que la souche wVulM. L'un des biais rencontré lors de l'analyse des expérimentations d'inoculation de ces deux souches réside dans la différence existant entre les doses initiales injectées : la souche wVulC est dix fois plus abondante dans un inoculat que la souche wVulM en raison des densités bactériennes présentes dans les ovaires des hôtes donneurs. Lorsque l'on compare, à doses injectées équivalentes, la virulence des deux souches, on constate que la souche wVulC est plus virulente que wVulM et ce pour tous les paramètres mesurés. Les quantifications de *Wolbachia* au sein des tissus receveurs démontrent que wVulC colonise et se multiplie certainement de manière plus importante que la souche wVulM. Cette forte multiplication pourrait expliquer en partie les différences de virulence constatées entre les deux souches ainsi que le caractère plus compétitif de wVulC suggéré dans l'étude des populations naturelles (Cordaux *et al.* 2004). Par ailleurs, ceci corrobore ce qui est observé au niveau des traits de vie de l'hôte natif *A. vulgare* où la souche wVulC est décrite comme plus virulente et ayant un coût plus important que la souche wVulM sur la survie et certains paramètres immunitaires d'*A. vulgare* (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Sicard *et al.* 2010). Cela est également à mettre en parallèle avec les niveaux de féminisation chez l'hôte natif, wVulC biaisant davantage les sex-ratio des portées que wVulM. Ceci suggère que les facteurs de féminisation sécrétés pourraient ne pas être les mêmes entre ces deux souches phylogénétiquement distantes.

A cette différence de virulence entre les deux souches, s'ajoute un effet de la dose injectée : plus la dose initiale inoculée est importante, plus le coût pour l'hôte est fort. De tels effets dose-dépendant ont été démontrés notamment chez les bac-

téries pathogènes *Vibrio sp.* rencontrés chez les huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea Edulis* (Jeffries 1982) et chez la bactérie *Pasteurella hemolytica* infectant des veaux appartenant à l'espèce *Bos taurus* (Yates *et al.* 1983). Lorsque sont comparées les densités d'une même souche de *Wolbachia* dans les tissus à chaque pas de temps, après injection des différentes doses, aucune différence n'est décelée et ces densités bactériennes atteignent un plafond à partir de 75 jours PI. L'effet de la dose inoculée est cependant net concernant l'apparition des premiers symptômes suivi du décès des individus injectés. Ceci suggère à première vue que densités de *Wolbachia* au sein des tissus et impacts sur le receveur ne sont pas directement liés, du moins après les 15 premiers jours PI. Nous pouvons cependant suspecter une relation entre la première phase de l'infection (entre 0 et 15 jours PI) et le retard observé au sein de l'apparition des symptômes de l'immunopathologie. L'importante réaction autophagique décrite dans Le Clec'h *et al.* (2012) serait ainsi déclenchée plus tardivement chez les animaux inoculés avec une dose initiale faible. La virulence des souches *wVulC* et *wVulM* contre leur nouvel hôte est d'autant plus intense que l'on utilise l'hémolymphe comme tissu vecteur du transfert. Les symptômes caractérisant la maladie surviennent donc plus tôt chez les animaux injectés avec de l'hémolymphe que chez ceux transinfectés via un broyat d'ovaires (à dose inoculée équivalente). La localisation des *Wolbachia* au sein des hémocytes (Chevalier *et al.* 2011) semble donc favoriser ces dernières. L'absence de broyage et de filtration de l'inoculat lors de l'injection d'hémolymphe évite le stress d'un passage dans le milieu extracellulaire ce qui maximise le nombre de bactéries viables injectées. Ces deux paramètres (i.e., localisation des bactéries et traitement de l'inoculat) peuvent permettre d'expliquer le pouvoir infectieux plus important des souches provenant de l'hémolymphe. En outre, les hémocytes pourraient agir comme vecteurs de *Wolbachia* en lui facilitant l'accès à certains tissus et cellules (cellules nerveuses, par exemple) ces dernières pouvant se révéler être moins accessibles aux *Wolbachia* libres dans le milieu extracellulaire.

Parmi les souches de *Wolbachia* féminisantes, wVulC s'avère être plus pathogène que wVulM à doses injectées équivalentes chez *P. d. dilatatus*. L'effet intrinsèque de la souche sur le receveur en cas de transfert horizontal est donc indéniable. En parallèle de cette démonstration, nous avons aussi mis en évidence un effet de la dose injectée pour une souche donnée : plus la dose inoculée est forte, plus l'effet sur le receveur est rapide. Par ailleurs, nous avons démontré que le type de "tissu source des *Wolbachia*" pouvait jouer sur les conséquences observées chez l'hôte receveur. En effet, les symbiotes provenant de l'hémolymphe colonisent plus facilement l'hôte receveur que ceux provenant des ovaires et induisent des effets plus rapides et plus forts aux mêmes doses inoculées. Ce résultat ouvre la question sur la diversité des populations de *Wolbachia* au sein même d'un hôte natif. Ainsi, les *Wolbachia* colonisant les ovaires sont-elles génétiquement différentes de celles infectant les hématocytes? Ces dernières seraient-elles plus virulentes que celles présentes dans les ovaires, maximisant de ce fait leur chance de coloniser d'autres hôtes lors de transferts horizontaux naturels?

Chapitre 3

Un petit tour chez les isopodes terrestres *Armadillidium vulgare* et *Armadillo officinalis*...

1 Introduction

Les transferts horizontaux de huit souches de *Wolbachia* d'isopodes terrestres chez l'hôte *P. d. dilatatus* ont mis en évidence trois types d'interactions entre le symbiote et son nouvel hôte *a priori* non coadapté (Le Clec'h *et al.*, *in review pour publication dans Evolution*) : (i) une forte virulence causant la mort de tous les individus transinfectés, (ii) l'installation des bactéries dans tous les tissus hôtes sans impact visible sur les traits de vie mais avec absence de transmission verticale à la descendance, (iii) l'installation des bactéries dans les tissus sans modification des traits de vie avec transmission à la génération suivante. Dans les deux premiers cas, l'établissement d'un nouveau système symbiotique est caduc, seul le dernier cas permet d'envisager la création d'une nouvelle symbiose entre partenaires qui n'ont pas co-évolué. Ces trois types d'interactions sont-elles retrouvées lorsque ces mêmes souches de *Wolbachia* sont injectées chez l'hôte *A. vulgare* ? Au sein de ce

troisième chapitre, nous avons étudié l'impact de ces huit souches de *Wolbachia* sur les traits d'histoire de vie de ce nouvel hôte, nous permettant ainsi d'évaluer la virulence des souches injectées chez cet hôte receveur. En parallèle des traits de vie mesurés chez ce nouvel hôte, nous avons quantifié la densité des *Wolbachia* dans trois organes (ovaires, SNC et hémocytes) afin d'évaluer la capacité de colonisation de ces endosymbiotes. Par la suite, notre étude s'est penchée sur la possibilité d'établissement d'une interaction transgénérationnelle entre les souches de *Wolbachia* inoculées et *A. vulgare* en testant la présence des bactéries au sein de la progéniture de ces derniers. Finalement, nous avons également injecté certaines souches de *Wolbachia* chez l'isopode terrestre *Armadillo officinalis*. En effet, il a longtemps été supposé que cette espèce était capable de résister à une infection par *Wolbachia*. Par l'intermédiaire des expérimentations de transfert et grâce aux quantifications bactériennes réalisées dans les tissus de ce receveur, nous leverons une partie du voile sur le "mystère" *A. officinalis*.

2 Quels impacts des *Wolbachia* sur les traits d'histoire de vie d'*A. vulgare* ?

Le même protocole expérimental que celui utilisé chez l'hôte *P. d. dilatatus* a été mis en place chez *A. vulgare* provenant de la lignée WX- échantillonnée à Helsingor (Danemark) (Le Clec'h *et al.*, *in review pour publication dans Evolution*). Les résultats obtenus mettent en évidence un effet beaucoup moins marqué des différentes souches de *Wolbachia* injectées. En effet, aucune souche n'apparaît pathogène pour l'hôte *A. vulgare*. Cependant, la souche *wCon* possède un impact négatif significatif sur la prise de poids des individus 200 jours après injection (moyenne $\pm$ se = 3,9010 $\pm$ 0,1366) et la souche *wVulM* native d'une population d' *A. vulgare* entraîne une augmentation significative de prise de poids des femelles (moyenne $\pm$ se = 5,0837 $\pm$ 0,4725 ; Table III-12, Figure III-12 A). En revanche, aucune des souches de *Wol-*

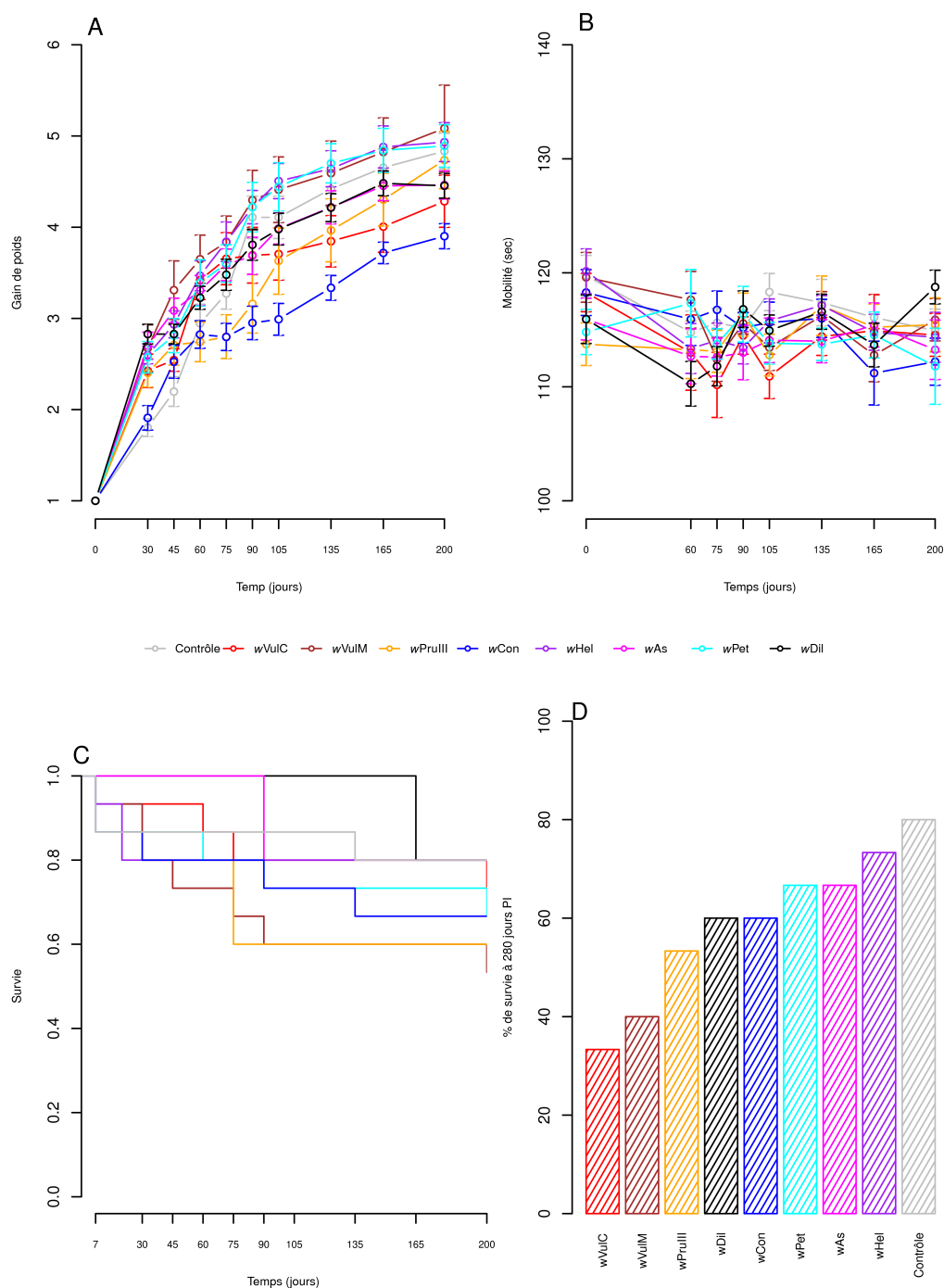


FIGURE III-12 – Suivis des traits d'histoire de vie d'*A. vulgare* suite aux injections de 8 souches de *Wolbachia* d'isopodes terrestres. (A) Prise de poids des femelles *A. vulgare* au cours des 200 jours post-injection (PI), (B) Mobilité des individus au cours des 200 jours PI, (C) Courbes de survie des femelles au cours des 200 jours PI, (D) Pourcentage de survie des individus à 280 jours PI.

bachia injectées n'influence la mobilité des individus contrairement à ce qui a été décrit chez *P. d. dilatatus* [(Le Clec'h *et al.* 2012) ; Figure III-12 B]. Si la virulence des trois souches féminisantes *wVulC*, *wVulM* et *wPruIII* est clairement moins importante que chez l'hôte *P. d. dilatatus*, les données de survie à 200 et 280 jours post-injection (PI) indiquent tout de même un impact négatif de ces mêmes souches chez *A. vulgare* (33,33 % de survie après injection de *wVulC*, 40 % après transfection par *wVulM* et 53,33 % suite à l'injection de *wPruIII* contre 80 % de survie pour le contrôle après 280 jours PI ; Table III-12 ; Figure III-12 C et D). Ces trois souches virulentes sont celles qui induisent une importante réaction autophagique dans le système nerveux central de *P. d. dilatatus* et la mort rapide de tous ces individus transinfectés. Bien que deux d'entre elles (*wVulC* et *wVulM*) soient natives de l'hôte *A. vulgare*, ces souches montrent également une certaine virulence chez le receveur *A. vulgare* même si la mortalité des animaux injectés survient beaucoup plus tardivement que celle observée après transinfection des hôtes *P. d. dilatatus*. De plus, aucun phénomène autophagique anormal n'est visible sur les coupes histologiques de SNC d'*A. vulgare* injectés avec ces trois souches féminisantes virulentes : l'immunopathologie rencontrée chez *P. d. dilatatus* n'est pas retrouvée chez *A. vulgare* et n'est donc pas la cause de la diminution de sa survie mais ceci laisse à penser une nouvelle fois qu'il pourrait y avoir un lien étroit entre virulence et féminisation (Le Clec'h *et al.*, *in review pour publication dans Evolution*).

Tableau III-12 – Impacts sur les traits d’histoire de vie d’*A. vulgare* des huit souches de *Wolbachia* injectées.

	Factor	Comparaison de tous les traitements à 200 jours PI			Comparaison de tous les traitements à 200 jours PI sans le traitement contrôle			Comparaison de tous les traitements à 200 jours PI sans le traitement contrôle et la souche <i>wCon</i> ¹			Comparaison de tous les traitements à 200 jours PI sans le traitement contrôle et la souche <i>wVulM</i> ²		
		<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>	<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>	<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>	<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>
Gain de poids (lme)	Dose	7	1.8036	0.9699	6	1.6144	0.9515	5	1.4308	0.9209	5	1.6427	0.8960
	Traitement	8	21.9281	0.0050	7	16.5107	0.0208	6	11.4984	0.0741	6	10.5963	0.1016
	Residus	120	0.0204	#	107	0.0209	#	94	0.0215	#	94	0.0191	#
Mobilité (lme)	Dose	7	0.0118	0.9999	6	0.0115	0.9999	5	0.0111	0.9999	5	0.0096	0.9999
	Traitement	8	7.6779	0.4655	7	7.4187	0.3866	6	6.0395	0.5351	6	6.7343	0.4570
	Residus	120	6.9541	#	107	7.0454	#	94	7.1546	#	94	7.2355	#
		Comparaison de tous les traitements à 200 jours PI			Comparaison de tous les traitements à 200 jours PI sans le traitement contrôle			Comparaison de toutes les souches injectées à 200 jours PI sans le traitement contrôle et les souches <i>wPruIII</i> et <i>wVulM</i> ¹			Comparaison de toutes les souches injectées à 200 jours PI sans le traitement contrôle et les souches <i>wPruIII</i> , <i>wVulM</i> et <i>wVulC</i>		
		<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>	<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>	<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>	<i>ddl</i>	deviance	<i>p</i>
Survie (Cox model)	Dose	7	2.5286	0.1117	6	2.5453	0.1106	4	2.6121	0.1060	3	0.0005	0.9809
	Traitement	8	8.7926	0.0030	7	8.1128	0.0043	5	4.6860	0.0304	4	1.8461	0.1742
	Residus	120	0.0013	#	107	0.0013	#	81	0.0006	#	68	0.0006	#

¹ L’injection de la souche *wCon* entraîne une prise de poids significativement plus faible des receveurs *A. vulgare*. Si l’on enlève du jeu de donné les valeurs obtenues pour *wCon*, il n’y a plus de différence dans la prise de poids entre les traitements.

² L’injection de la souche *wVulM* induit une augmentation de la prise de poids des individus. Si l’on enlève du jeu de donné les valeurs obtenues pour les animaux injectés avec *wVulM* tout en laissant les valeurs obtenues pour ceux inoculés avec *wCon*, la différence entre les autres souches n’est plus significative pour ce qui est de la prise de poids. Après avoir enlevé du jeu de donné les valeurs de *wVulM*, la déviance par rapport au modèle est plus faible que celle calculée après que l’on ait enlevé les valeurs de *wCon*. De ce fait, il est possible de conclure que la déviance est davantage expliquée par le traitement *wVulM* que par l’injection de *wCon*.

3 Une colonisation de tous les tissus hôtes

Comme ce qui était observé chez *P. d. dilatatus*, toutes les souches de *Wolbachia* injectées sont capables de s'implanter dans tous les tissus hôtes testés 200 jours PI (ovaires, SNC et hémocytes), à des densités similaires à celles mesurées chez leurs hôtes natifs respectifs (Figure III-13). Les seules exceptions notables demeurent une présence plus importante des souches *wAs* dans le SNC (Welch *t-test* ; $t = 12,9405$; $ddl = 1$; $p = 0,0431$) et *wPet* dans les hémocytes (Welch *t-test* ; $t = 23,4916$; $ddl = 1$; $p = 0,0271$) par rapport aux densités observées chez leurs hôtes natifs respectifs. En revanche les densités de la souche *wCon* dans les ovaires d'*A. vulgare* inoculés sont plus faibles que celles quantifiées chez l'hôte natif *Cylisticus convexus* (Welch *t-test* ; $t = -18,6495$; $ddl = 1$; $p = 0,0341$).

4 Hypothèses quant à la défaillance de la transmission verticale

Bien que les densités des différentes souches de *Wolbachia* injectées soient abondantes dans les gonades, aucune transmission verticale n'a pu être mise en évidence, y compris chez les animaux injectés avec leurs souches natives. Cette absence de transmission bactérienne est sans doute liée à un très faible taux de reproduction des animaux, y compris des individus contrôles bien que tous les individus vivant après 200 jours post-injection semblaient être en état de se reproduire. Ceci peut être causé par des paramètres défavorables dans l'élevage (problème dans le pH du substrat utilisé) ou bien une mise en reproduction trop tardive des femelles après les injections, ces dernières étant âgées d'un an (± 3 mois). Par ailleurs, les différentes souches de *Wolbachia* injectées pourraient avoir un impact négatif sur l'attractivité des femelles, modifiant leurs odeurs de manière qualitative et quantitative. Chez les oniscidés, la reconnaissance d'un congénère, de son statut physiologique, est permise

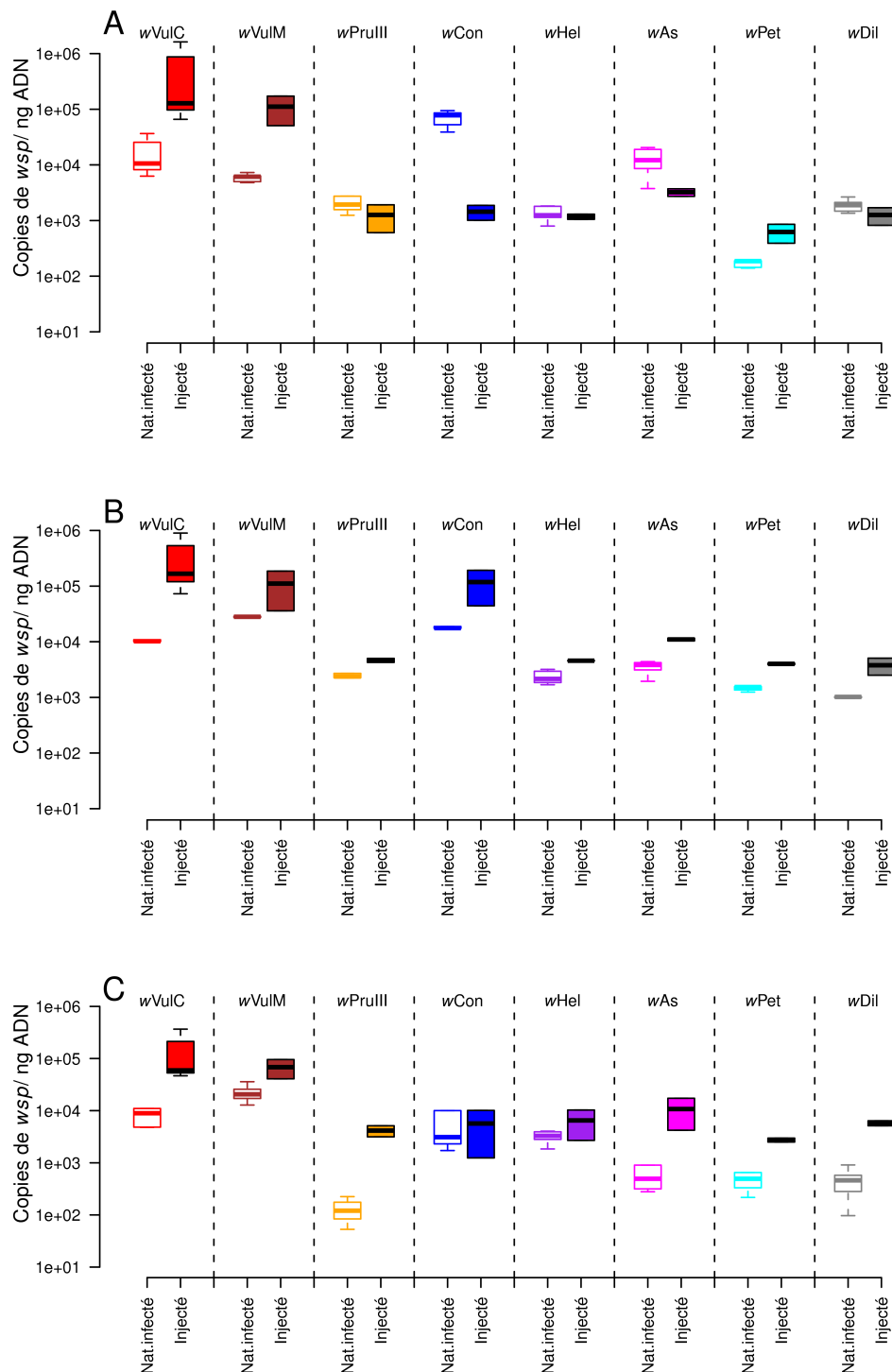


FIGURE III-13 – Densités des différentes souches de *Wolbachia* (nombre de copies du gène *wsp*/ng d'ADN) dans les trois types de tissus testés chez le receveur *A. vulgare* et comparaison avec les taux de présence des souches bactériennes dans les mêmes organes des hôtes natifs. (A) ovaires (B) système nerveux central (SNC) et (C) hémocytes 200 jours après injection.

par la perception de substances chimiques de type odeurs et phéromones [Richard com. pers., (Lefebvre 2002)]. Or, si la présence de *Wolbachia* perturbe ces signaux, la reproduction des animaux inoculés pourraient en être davantage altérée que celle d'individus naturellement infectés. Néanmoins, le taux de reproduction très faible des individus injectés et des animaux contrôles ne permet pas de conclure de manière stricte sur l'absence de réussite d'une transmission maternelle suite aux transferts horizontaux de multiples souches de *Wolbachia* utilisées dans cette étude.

5 *Wolbachia*, entre plasticité et virulence

Si la transmission verticale reste à démontrer et paraît délicate notamment chez des hôtes phylogénétiquement éloignés (Rigaud *et al.* 2001), le succès des injections des différentes souches de *Wolbachia* chez l'hôte *A. vulgare* met en évidence une fois de plus la remarquable plasticité de cet endosymbiote, capable de se maintenir et de coloniser tous les tissus d'hôtes parfois relativement distants phylogénétiquement (Michel-Salzat & Bouchon 2000). Par ailleurs, une certaine virulence des trois souches féminisantes induisant une forte pathologie chez *P. d. dilatatus* est observée chez *A. vulgare*. Cette plus faible virulence ne serait ici pas due au manque de tolérance et à une tentative de résistance vis à vis d'une importante multiplication du symbiote mais pourrait refléter une situation où l'hôte pâtit du détournement de certaines ressources de ses cellules, de la présence de facteurs de virulence ou de facteurs de féminisation émis par *Wolbachia*. L'important effet pathogène rencontré chez *P. d. dilatatus* après injection de *wVulC*, *wVulM* et *wPruIII* (Le Clec'h *et al.*, *in review pour publication dans Evolution*) se traduit par la superposition du coût dû au symbiote associé à l'importante réaction auto-immune de l'hôte. L'immunopathologie induite par la réaction exacerbée de l'hôte va de ce fait, masquer le coût réel dû au symbiote. La plus faible virulence causée par les trois souches féminisantes de *Wolbachia* chez le receveur *A. vulgare* pourrait être expliquée par

l'absence de réponse de l'hôte face à leur multiplication dans les tissus, mettant en évidence le coût réel de *Wolbachia* sur son hôte ainsi que par la co-évolution existant entre *wVulC*, *wVulM* et *A. vulgare*.

Box : Les *Wolbachia* sont-elles capables d'infecter l'isopode terrestre *Armadillo officinalis* ?

Armadillo officinalis, inféodé au pourtour méditerranéen et appartenant à la famille des Armadillidae, est un cloporte dont la position phylogénétique est relativement basale dans l'arbre des isopodes terrestres (Michel-Salzat & Bouchon 2000). Chez cette espèce, dont on ne recense pas jusqu'à présent de population infectée par l'endosymbiote *Wolbachia*, les transferts horizontaux de la souche *wVulC* (souche féminisante d'*A. vulgare*) ont été décrits comme n'aboutissant pas à une infection persistante, ce qui pouvait sous-entendre une résistance accrue de cet hôte vis-à-vis de *Wolbachia* (Bouchon *et al.* 1998 ; Juchault *et al.* 1974). Cependant, les méthodes qui avaient permis de conclure à la non installation de la souche de *Wolbachia wVulC* chez *A. officinalis* étaient (i) l'observation de coupes de tissus en microscopie électronique à transmission et (ii) la transformation des caractères sexuels mâle suite à la féminisation. Or, ces deux méthodes montrent des limites certaines. En effet, la microscopie n'est vraiment efficace que si les *Wolbachia* sont présentes en fortes densités et la modification de traits morphologiques mâles infectés par une souche féminisante (i.e., régression des stylets copulateurs) n'est pas du tout un critère absolu : une souche féminisante de *Wolbachia* peut s'implanter dans les tissus d'un hôte nouveau sans pour autant le féminiser (Rigaud *et al.* 2001). Il n'y avait donc là pas de preuves claires de la résistance d'*Armadillo* vis-à-vis de *Wolbachia*. Nous avons donc réalisé des expériences permettant de répondre clairement à la question suivante : Les *Wolbachia* sont-elles capables d'infecter, de se maintenir mais également de se multiplier chez l'hôte *A. officinalis* ? Afin de répondre à cette question, 4 souches de *Wolbachia* ont été choisies pour être transférées horizontalement chez *A. officinalis* : *wVulC* (souche féminisante chez son hôte natif *A. vulgare* et pathogène

chez *P. d. dilatatus* (Le Clec'h *et al.* 2012), montrant des concentrations importantes dans les organes de son hôte natif), *wCon* [souche induisant de l'IC chez son hôte natif *Cylisticus convexus* et qui est également présente à de fort taux dans les tissus hôtes, comme *wVulC* dont elle est phylogénétiquement proche (Cordaux *et al.* 2012)], *wDil* (souche phylogénétiquement distante de *wCon* mais provoquant également de l'IC chez son hôte natif *P. d. dilatatus* et dont la multiplication chez ce dernier, après transfert horizontal, est plus faible que *wCon*), et *wHel* [souche dont la multiplication est faible chez l'hôte natif et quasi nulle après transfert horizontal chez les receveurs testés. Elle est également la plus éloignée phylogénétiquement des trois autres souches (Cordaux *et al.* 2012)]. Le choix de l'hémolymph pour réaliser les transferts bactériens fait suite aux conclusions présentées dans le chapitre 2 et dans l'article «Differential impacts of two *Wolbachia* strains on the same host after transinfection : strain or dose effects?» suggérant un meilleur pouvoir infectieux de l'hémolymph, tissu à la base d'une probable voie naturelle de transfert horizontal (Rigaud & Juchault 1995). Pour chacune des souches sélectionnées, neuf femelles *A. officinalis* ont été injectées (suivant le protocole décrit dans l'article précité) en deux réplicats biologiques indépendants. Les résultats de quantification des différentes souches de *Wolbachia* dans les trois tissus analysés (ovaires, système nerveux central (SNC) et hémocytes) à 30 et 60 jours PI mettent en évidence l'implantation de toutes les souches bactériennes injectées dans tous les tissus (Figure III-14). De plus, les densités de *Wolbachia* augmentent entre 30 et 60 jours PI (différences significatives entre les densités bactériennes totales au sein de tous les tissus à 30 jours et ceux observés après 60 jours PI, Kruskal-Wallis ; $W = 43,9657$; $df = 1$; $p < 0,0001$; Figure III-14). Par ailleurs, les différentes souches injectées colonisent de manière significativement différente les tissus testés (Kruskal-Wallis ; $W = 8,8545$; $df = 3$; $p = 0,0312$). D'une manière générale, la souche *wDil* est présente en plus fortes densités que *wHel*, suivie de *wCon* et *wVulC*. Concernant les tissus colonisés,

les hémocytes d'*A. officinalis* constitue le compartiment cellulaire dans lequel les densités de *Wolbachia* sont les plus importantes (quelque soit la souche considérée), suivi du tissu nerveux et finalement des ovaires (différence significative entre les taux bactériens des différences souches au sein des différents tissus testés, Kruskal-Wallis ; $W = 6,2248$; $df = 2$; $p = 0,0444$).

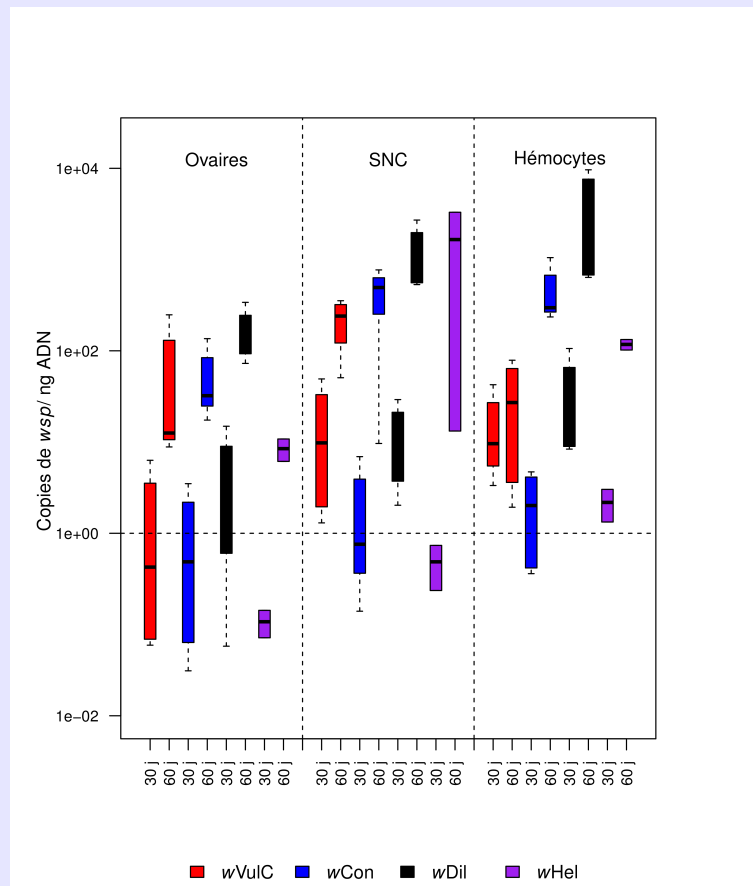


FIGURE III-14 – Taux d'infection des tissus ovariens, nerveux et immunitaires par les souches de *Wolbachia* *wVulC*, *wCon*, *wDil* et *wHel* chez des femelles *A. officinalis* transfectées à partir d'hémolymphes provenant d'individus infectés (en nombre de copies *wsp*/ng ADN total).

Toutes les souches de *Wolbachia* injectées sont donc capables de coloniser l'ensemble des tissus testés et de s'y multiplier. Les taux relativement plus faibles de la souche *wVulC*, comparés à ceux quantifiés chez *P. d. dilatatus* ou *A. vulgare* 60 jours PI (Le Clec'h *et al.* 2012), peuvent permettre d'expliquer les conclusions des études précédentes (Bouchon *et al.* 1998 ; Juchault *et al.* 1974) : Les bactéries étaient trop

peu nombreuses pour être détectées en microscopie électronique et pour induire une féminisation des mâles visible dès 60 jours PI. *A. officinalis* ne constitue donc pas l'espèce d'exception chez les isopodes terrestres, capable de résister à la colonisation de la souche féminisante *wVulC* ou aux autres souches testées, bien que la persistance de ces souches sur le long terme reste à démontrer. La faible colonisation des ovaires pourrait suggérer une quasi absence de transfert vertical suite à l'acquisition des souches via une transmission horizontale. Ceci permettrait d'expliquer, en plus du faible échantillonnage (en terme de populations et d'individus collectés), pourquoi aucune infection naturelle chez cette espèce n'a jusqu'alors été détectée.

6 Conclusion générale sur la Partie III

A l'issue de cette troisième partie, les *Wolbachia* nous apparaissent comme des endosymbiotes dotés d'une plasticité remarquable lors de transferts horizontaux. En effet, toutes ces souches bactériennes sont capables (i) de coloniser tous les tissus de leurs nouveaux receveurs (soit des environnements inconnus) même si ces derniers sont phylogénétiquement distants au sein de l'ordre des isopodes terrestres (Cordaux *et al.* 2012) et pour certaines, (ii) de se transmettre verticalement à la descendance de ces nouveaux hôtes. Néanmoins, certaines souches féminisantes (*wVulC*, *wVulM* et *wPruIII*) montrent d'importantes modifications de leurs niveaux de virulence puisqu'elles sont pathogènes pour le receveur *P. d. dilatatus*. Inoculées chez *A. vulgare*, ces souches induisent une altération de la survie de ces receveurs sur le long terme, bien que deux d'entre elles (*wVulC* et *wVulM*) soient natives de cet hôte (Bouchon *et al.* 2008) : elles sont donc bien virulentes même si elles le sont de façon modérée pour *A. vulgare*, comme d'ailleurs lorsqu'elles sont maternellement héritées (même si nous ne devons pas perdre de vue que les « femelles » infectées par la voie verticale sont en réalité des mâles féminisés) (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Sicard *et al.* 2010). Ces résultats renforcent le lien supposé entre virulence et facteurs de féminisation évoqué précédemment. Par ailleurs, le gradient de virulence est toujours effectif chez *A. vulgare* : la souche *wVulC* est la plus virulente, vient ensuite *wVulM* et enfin *wPruIII* comme ce qui est observé pour l'effet pathogène induit par ces souches chez *P. d. dilatatus*. Cette variation de l'effet pathogène des souches *wVulC* et *wVulM* après transfert horizontal chez *P. d. dilatatus* a été expérimentalement mise en évidence : pour une même dose injectée, *wVulC* induit un coût plus fort sur son receveur que la souche *wVulM*. La virulence de *Wolbachia* est donc dépendante du génotype de la souche considérée mais également, pour une même souche, de la dose injectée. Ainsi, comme pour de nombreux pathogènes, plus la dose inoculée est grande, plus l'impact (maladie) sur le phénotype de l'hôte est fort et rapide (Jeffries 1982 ; Yates *et al.* 1983). Par ailleurs, la rapidité de l'effet pathogène chez le receveur

peut dépendre du tissu d'où proviennent les symbiotes. En effet, les *Wolbachia* associées aux hémocytes présentent un pouvoir infectieux plus grand qu'un broyat d'ovaires. Protégés dans les hémocytes, vecteurs de l'endosymbiote (Chevalier *et al.* 2011 ; Rigaud *et al.* 1991), les *Wolbachia* sont plus compétitives que celles ayant subi le broyage puis la filtration des ovaires. Cette explication n'est cependant valable que si l'on suppose l'homogénéité des populations de *Wolbachia*, ce qui n'a pas été testé jusqu'à présent. Il est en effet possible que chaque tissu hôte héberge des populations distinctes de symbiotes, n'ayant pas les mêmes aptitudes à la plasticité phénotypique, la même virulence ni le même génotype. Ainsi, à chaque génération d'hôtes, la population de *Wolbachia* ayant été transmise verticalement pourrait se disperser lors de l'embryogenèse pour coloniser tous les tissus. Par la suite, les pressions de sélection exercées par leur nouvel environnement tissulaire pourraient permettre la sélection de *Wolbachia* dites « spécialisées », avec des niveaux de virulence différents. D'un point de vue évolutif, la sélection des *Wolbachia* présentes dans les ovaires, qui vont donc être transmises à la descendance, porterait sur des bactéries plutôt moins virulentes que celles infectant les hémocytes. En effet, ces dernières ne pourront se transmettre qu'à la faveur d'un transfert horizontal, événement certainement plus rare qu'une reproduction, et, de ce fait, les seules qui pourront être transmises à un nouvel hôte seraient celles capables de coloniser et de se multiplier rapidement dans les tissus du receveur. A l'heure actuelle, seul le séquençage du génome ainsi que l'analyse du transcriptome des *Wolbachia* échantillonnées au sein de différents tissus (ovaires, SNC, hémocytes, caecum etc.) pourrait permettre de mettre en évidence de potentielles disparités génétiques ou épigénétiques entre les populations de symbiotes.

Les *Wolbachia* sont donc capables d'infecter divers receveurs à la suite de transferts horizontaux expérimentaux. Mais qu'en est-il des voies de transferts naturels de ces endosymbiotes ? Très peu de voies ont été, jusqu'à présent, démontrées et

la question d'un possible transfert via la voie trophique chez les isopodes terrestres reste encore en suspens... Se peut-il que certaines *Wolbachia* résistent à leur passage dans le tube digestif des cloportes et colonisent les tissus de leur nouvel hôte ?

Quatrième partie

Wolbachia et ses chemins de
traverse : Ou comment acquérir un
endosymbiote suite à son repas....

1 Introduction

Bien que les transferts horizontaux de *Wolbachia* ne semblent pas être des phénomènes anecdotiques d'un point de vue évolutif et phylogénétique (Cordaux *et al.* 2001 ; Kraaijeveld *et al.* 2011), les mécanismes biologiques ainsi que les différentes voies écologiques permettant ces transferts sont encore loin d'être tous déterminés. A l'heure actuelle, deux voies pouvant assurer la transmission horizontale ont été mises en évidence : les transferts de *Wolbachia* utilisant les parasitoïdes comme vecteurs (Heath *et al.* 1999 ; Vavre *et al.* 1999) et ceux mettant en jeu les blessures et contacts sanguins chez les crustacés terrestres (Rigaud & Juchault 1995). Cependant, l'existence d'autres chemins autorisant ces transferts aux échelles intra ou interspécifiques sont suspectés, notamment l'utilisation de la chaîne alimentaire par *Wolbachia*. Plusieurs études phylogénétiques des hôtes et des *Wolbachia*, portant sur les isopodes terrestres et quelques uns de leurs prédateurs (Cordaux *et al.* 2001) ou encore sur les araignées et leurs proies (Cordaux *et al.* 2001 ; Yun *et al.* 2011) n'ont pas permis de démontrer une utilisation de la voie trophique. Par ailleurs, des études expérimentales visant à évaluer une potentielle transmission horizontale entre des proies infectées par *Wolbachia* et leurs prédateurs acariens (Enigl *et al.* 2005) ou entre des moustiques infectés par la souche *wMelPop* et leurs espèces prédatrices (Hurst *et al.* 2012) ne se sont pas avérées concluantes. En ce qui concerne les crustacés terrestres, Juchault *et al.* (1974) avait testé à l'échelle intraspécifique l'existence de transferts horizontaux de *Wolbachia* par la voie trophique en faisant consommer à des cloportes non-infectés des morceaux d'isopodes terrestres infectés par *Wolbachia*. L'analyse des tissus ovariens des consommateurs à l'aide de la microscopie électronique n'avait alors révélé la présence d'aucune bactérie endosymbiotique.

Dans ce chapitre, nous avons testé de nouveau la possibilité de transferts horizontaux par voie trophique dans deux situations écologiques différentes : (i) cannibalisme entre deux *A. vulgare*, l'un infecté par la souche *wVulC* (i.e., la proie)

et l'autre non (i.e., le prédateur), (ii) prédation d'un *A. vulgare* infecté par *wVulC* (i.e., la proie) par un *P. d. dilatatus* non infecté (i.e., le prédateur). Pour cela, nous avons exploité les comportements de prédation que l'on peut rencontrer naturellement chez les cloportes (Edney *et al.* 1974 ; Pokarzhevskii *et al.* 2003) et nous les avons quelque peu facilités expérimentalement.

Cannibalism and predation : A new ecological route for *Wolbachia* horizontal transmission in woodlice ?

Submitted to Functional Ecology

Winka Le Clec'h, Frédéric Chevalier, Lise Genty, Joanne Bertaux, Didier
Bouchon, Mathieu Sicard

The α -proteobacteria *Wolbachia* are the most widespread endosymbionts in arthropods and nematods. Mainly maternally inherited, these so-called sex parasites have selected some strategies that increase their vertical dispersion in host populations. However, the lack of congruence between the *Wolbachia* and their host phylogenies suggests frequent horizontal transfers. The potential ecological routes that allow these passages from one host to another remain largely unknown. One obvious way that could be used, for horizontal *Wolbachia* transfers is predation. The aim of this study was to test whether this route was possibly taken by *Wolbachia* if an uninfected terrestrial isopod ate an infected one. Three and six months after having eaten *Armadillidium vulgare* harbouring *Wolbachia*, the predator-recipients (the two woodlice *A. vulgare* and *Porcellio dilatatus dilatatus*) that were initially *Wolbachia* free were tested positive for the presence of *Wolbachia* by both quantitative PCR and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). However, *Wolbachia* titers were very low in the tested tissues (i.e., ovaries, central nervous system and hemocytes) and decreased over time. These results show that both predation and cannibalism constitute a bridge for *Wolbachia* to horizontally transfer between woodlice : The bacteria clearly reached host tissues including the ovaries after having crossed the intestine barrier.

Key words : *Armadillidium vulgare*, endosymbiont, horizontal transfers, *Porcellio dilatatus dilatatus*

1.1 Introduction

Wolbachia pipientis are endocyttoplasmic α -proteobacteria widespread among arthropods (Hilgenboecker *et al.* 2008 ; Werren 1997) and filarial nematodes (Bandi *et al.* 1998). These symbionts are mainly maternally inherited and some extended phenotypes have been naturally selected to increase their vertical transmission through generations. The extended phenotypes of the *Wolbachia* in their hosts that lead to increase the number of infected females are cytoplasmic incompatibility (Serbus

et al. 2008 ; Werren 1997), *male killing* (Jaenike 2007a), thelytokous parthenogenesis (Huigens *et al.* 2000) and feminization of genetic males (Bouchon *et al.* 2008). Even if the vertical transmission corresponds to the main way for *Wolbachia* spread, some co-phylogenetic studies have shown a lack of congruence between host and symbiont phylogenies strongly suggesting that horizontal transfers of *Wolbachia* are possible and not anecdotal (Cordaux *et al.* 2001 ; Kraaijeveld *et al.* 2011). These horizontal transfers of *Wolbachia* seem to be favoured when donor and recipient hosts are ecologically connected. Indeed, Heath *et al.* (1999) demonstrated that *Wolbachia* could pass from *Drosophila simulans* to its parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* as it developed into its host. In the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, Rigaud and Juchault (1995) have experimentally demonstrated a new path for horizontal transfer of *Wolbachia* via blood contact between injured animals. As horizontal transfers of *Wolbachia* seem to occur frequently at the evolutionary scale, some other ecological routes for such transfers can be suspected including trophic ones (Rigaud & Juchault 1995 ; West *et al.* 1998). Some studies sought to demonstrate the role of predator-prey interactions in the passage of *Wolbachia* from one host species to another in spiders (Cordaux *et al.* 2001 ; Yun *et al.* 2011), mites (Enigl *et al.* 2005) and in some predators of mosquitoes that were infected by the pathogenic *Wolbachia* strain *wMelPop* (Hurst *et al.* 2012) but to this date all the results were negative. In this context, Juchault *et al.* (1974) fed some uninfected *A. vulgare* with the pieces of the body of individuals of the same species infected with *Wolbachia* and found no infection in the eater. However, in that case, the presence of *Wolbachia* in the recipient was only tested in ovaries by transmission electron microscopy which offers only limited sample prospection and is thus not convenient to detect specifically few quantities of *Wolbachia*. In the present study, we tested the occurrence of horizontal transfers of *Wolbachia* via (i) cannibalism between two *A. vulgare* one infected and the other not infected, and (ii) predation when a *Porcellio dilatatus dilatatus* eats an infected *A. vulgare*. To do so, we designed an experiment

that increased the probability of predation and cannibalism for the woodlice (Edney *et al.* 1974) : Before putting predator and prey together, infected “prey” individuals were weakened by withdrawing a big amount of hemolymph while uninfected “predator” individuals were starved. This way, within two days all the “prey” individuals were eaten by “predator” individuals. In the months following the predation, the presence and quantities of *Wolbachia* in the tissues of the “predators” were assessed by quantitative PCR and Fluorescence *in situ* Hybridization. Thereby, we show for the first time the occurrence of *Wolbachia* in an initially uninfected host that ate an infected one.

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Biological materials

All the animals used in these experiments were grown at 20°C in plastic breeding boxes, in natural photoperiod, on a moistened potting mix derived from peat from sphagnum moss (pH = 6.4 and conductivity = 50.0 mS/m) with dead lime-tree leaves as a food source. The “predators” (i.e., animals eating an infected terrestrial crustacean) of all experiments came from controlled asymbiotic (i.e., without any *Wolbachia*) lineages of *Armadillidium vulgare* and *Porcellio dilatatus dilatatus*. The animals that served to create the asymbiotic *A. vulgare* and *P. d. dilatatus* control lineages were collected respectively in Nice (France) in 1967 and in Rom (France) in 1988 and were reared since then in the laboratory. Donors of *Wolbachia*, thereafter called the “preys” (i.e., animals eaten by the “predators”), were *A. vulgare* infected with the *wVulC* *Wolbachia* strain, from a controlled infected lineage created with animals sampled in Niort (France) and reared in the laboratory since 1961.

1.2.2 Cannibalism and predation experiments

Thirty one year-old asymbiotic *A. vulgare* and *P. d. dilatatus* females were placed to starve during three months in rearing boxes with no other food source than the

substrate (i.e., no dead lime-tree leaves). After three months, starving *A. vulgare* or *P. d. dilatatus* “predators” were individually placed in boxes with one *A. vulgare* “prey”. Before being placed together with the “predator”, the *A. vulgare* “prey” were weakened by collecting 10 μ L of their hemolymph after percing their cuticle with a thin needle (Braquart-Varnier *et al.* 2008). A part of the collected hemolymph served to check the *Wolbachia* infection status of the “prey”. After two nights, all the “preys” had been eaten by the “predators”. “Predators” were then conserved in individual boxes with substrate and lime-tree leaves at libitum as a food source. For each “predator” species, animals were dissected at both 90 days and 180 days post-ingestion (PI) for DNA extraction and FISH experiments.

1.2.3 Tissue samples and DNA extractions for *Wolbachia* quantifications

Total DNA was extracted from the hemocytes collected from each “prey” and the ovaries, central nervous system (i.e., nerve cells and neighbouring adipocytes), and hemocytes (i.e., immune cells) of each “predator” after dissection at 90 days and 180 days PI as described by Kocher *et al.* (1989). For each sample, the concentration and quality (ratios OD 260/280 nm and 260/230 nm) of the extracted DNA were measured using the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo) to remove any low quality DNA sample.

1.2.4 Quantification of *Wolbachia* in host’s tissues by quantitative PCR

The quantification of *Wolbachia* by quantitative PCR (qPCR) was performed on 15 “predators” per species (i.e., *A. vulgare* and *P. d. dilatatus*) at 90 days PI and on 13 “predators” for *P. d. dilatatus* and two for *A. vulgare* at 180 days PI. All the qPCR reactions were performed using LightCycler 480 system (Roche) as follows : 10 min at 95°C, 45 times [10 sec at 95°C, 10 sec at 60°C, 20 sec at 72°C]. A melting curve (65°C to 97°C) was recorded at the end of each reaction in order to check the oneness of the PCR product. The reaction mixture consisted of 5 μ L of SYBR-

Green MasterMix (Roche), 0.5 μL of each 10 μM specific primers [wsp208f (5'-TGG-TGC-AGC-ATT-TAC-TCC-AG-3') and wsp413r (5'-TCG-CTT-GAT-AAG-CAA-AAC-CA-3')], amplifying 205 pb of the single-copy *Wolbachia* surface protein (*wsp*) gene, 3 μL of sterile water, and 1 μL of DNA (between 10 ng and 80 ng of DNA). Standard curve was plotted using seven dilutions of wsp purified PCR product (*wsp* copies. μL^{-1} : 2.63×10^0 , 2.63×10^1 , 2.63×10^2 , 2.63×10^3 , 2.63×10^4 , 2.63×10^5 , 2.63×10^6 , 2.63×10^7). The number of *wsp* copies was estimated according to the standard curve. The total DNA quantity (i.e., host + *Wolbachia*) of each sample was used to normalize the resulting *wsp* gene copy counting. The results are thus given in number of *wsp* copies by ng of total DNA.

1.2.5 *Wolbachia* localization in “predator” hemocytes using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Hemocytes were sampled from “predators” of each species (i.e., two *A. vulgare* females and five *P. d. dilatatus* females) 180 days PI and pooled in a microtube kept on ice. Fluorescence *in situ* Hybridization and DAPI staining were performed according to Chevalier *et al.* (2011). Detection was performed with an epifluorescent microscope (Axio Observer-A1, Zeiss) with Apotome (structured illumination) equipped with a 63X/1.25 objective (oil immersion) and with the AxioVision 4.8.1 software (Zeiss). The number of hemocytes and their *Wolbachia* colonization status were counted on ten random images per species, using ImageJ software [version 1.45; (Rasband 1997)]. Hemocytes touching the image borders (i.e., incomplete ones) were ignored.

1.2.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 2.10.1). *Wolbachia* density in tissues for the two “predator” species between 90 and 180 days PI were compared with a Kruskal-Wallis or pairwise comparison Wilcoxon tests because

data distribution did not follow a normal distribution (Shapiro test, $p < 0.05$).

1.3 Results

1.3.1 *Wolbachia* quantifications into the different host tissues of “predators”

All the “preys” were infected by high titers of *Wolbachia* (mean $\pm$ se of *Wolbachia*/DNA ng : $4.62 \times 10^3 \pm 4.57 \times 10^2$, Fig. 1) in accordance to the titers previously reported in Le Clec’h *et al.* (2012). The *Wolbachia* were quantified by qPCR in three “predator” tissues : ovaries, central nervous system (CNS) and hemocytes at 90 and 180 days post-ingestion (PI) and in hemocytes of the symbiotic “preys”. At 90 days PI, all tested “predators” from both species (i.e., *A. vulgare* and *P. d. dilatatus*) exhibited *Wolbachia* in all the tested tissues but at low densities comprised between one and 100 *Wolbachia* per DNA ng (Fig. IV-1). These *Wolbachia* rates were higher in *A. vulgare* the native host of *wVulC* than in *P. d. dilatatus* (Kruskal-Wallis test : $W = 6.9824$, $df = 1$, $p = 0.0082$) and a global comparison between tissues highlighted higher titers of *Wolbachia* in hemocytes and CNS than in ovaries (Kruskal-Wallis test : $W = 14.7655$, $df = 2$, $p = 0.0006$).

At 180 days PI, the quantification of *Wolbachia* in animals from both species showed that all individuals were infected but at even lower densities than those observed at 90 days PI (Kruskal-Wallis test : $W = 4.0589$, $df = 1$, $p = 0.0433$), particularly for *P. d. dilatatus* hemocytes for which the number of bacteria significantly dropped (Wilcoxon test, $W = 42$, $df = 20$, $p = 0.0195$; Fig. IV-1). Moreover not all organs in all individuals were infected : In *P. d. dilatatus* “predators”, only four out of 15 ovary samples were *Wolbachia* positive, all the CNS and hemocytes samples were *Wolbachia* positive while, in *A. vulgare* “predators”, half of the CNS and hemocytes samples were *Wolbachia* positive and no *Wolbachia* was detected in ovaries. However, at this time point, 87 % (13/15) of *A. vulgare* individuals were dead. We assume that this high mortality rate was due to their isolation (i.e., one per box) and the

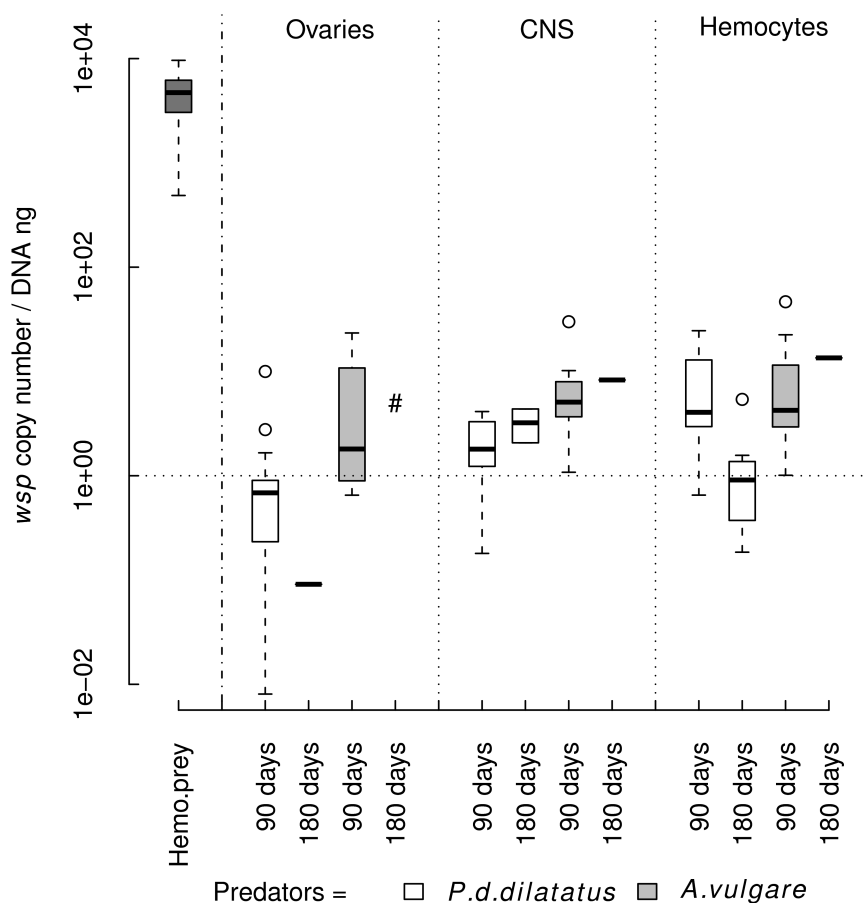


FIGURE IV-1 – *Wolbachia* loads in CNS, ovaries and hemocytes of the “predators” *Porcellio d. dilatatus* and *Armadillidium vulgare*. The *Wolbachia* quantifications performed at 90 and 180 days post-ingestion (PI) revealed that the symbiont colonizes at low level all the tissues of the asymptomatic “predators” after the ingestion of symbiotic “preys”. Comparison of the *Wolbachia* density between the two predator species (i.e., *P. d. dilatatus* or *A. vulgare*) revealed that bacterial rates were higher in *A. vulgare* native host of *wVulC* strain at 90 and 180 days PI. If the *Wolbachia* load decreased in ovaries and hemocytes for *P. d. dilatatus* between 90 and 180 days PI, the CNS was always the most colonized tissue with a low but stable number of symbiont per DNA ng for both species. (Hemo.Preys : The *Wolbachia* titer in the “prey” hemolymph; # : No *A. vulgare* were infected by *Wolbachia* among the two tested animals).

lack of social contacts that are strongly required for this species which exhibits an important gregarious lifestyle (Warburg *et al.* 1984). Comparisons of the *Wolbachia* densities for each tissue (Kruskal-Wallis test : $W = 11.8031$, $df = 2$, $p = 0.0027$) and each species (Kruskal-Wallis test : $W = 10.5718$, $df = 1$, $p = 0.0011$) between 90 and 180 days PI revealed that the *Wolbachia* titers was always higher in *A. vulgare* than in *P. d. dilatatus* (Fig. IV-1). The tissue that exhibited the most stable and highest quantities of *Wolbachia* was the CNS (Fig. IV-1). In hemocytes and particularly in ovaries, *Wolbachia* colonization of a “predator” after ingestion of a symbiotic “prey” was less intense after six months than after three months but the *Wolbachia* were still detectable in most of the cases (Fig. IV-1).

1.3.2 Detection of *Wolbachia* in the “predator” hemocytes from both species using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Wolbachia quantification by qPCR revealed that “predators” were infected by *Wolbachia* at a low level after the ingestion of symbiotic (i.e., with *Wolbachia*) “preys”. This was confirmed by FISH detection of *Wolbachia* with specific probes on one pool of hemolymph per species, with two animals for *A. vulgare* and five for *P. d. dilatatus* at 180 days PI. Hemocytes of both *P. d. dilatatus* (Fig. IV-2 A and B) and *A. vulgare* (Fig. IV-2 C and D) “predators” were colonized (3 and 8 % respectively). The fact that the probes target the transcript of the 16S rRNA gene further indicates that the *Wolbachia* were alive.

1.4 Discussion

Wolbachia are the most common endosymbiont in arthropods, estimated to infect 40 % of the terrestrial arthropod species (Zug & Hammerstein 2012). The main transmission route of these secondary symbionts is the vertical route (from mother to offspring) but, due to the facultative nature of the relationship with their hosts, the association can be lost at the evolutionary scale (Mergot & Poinot 2009). One

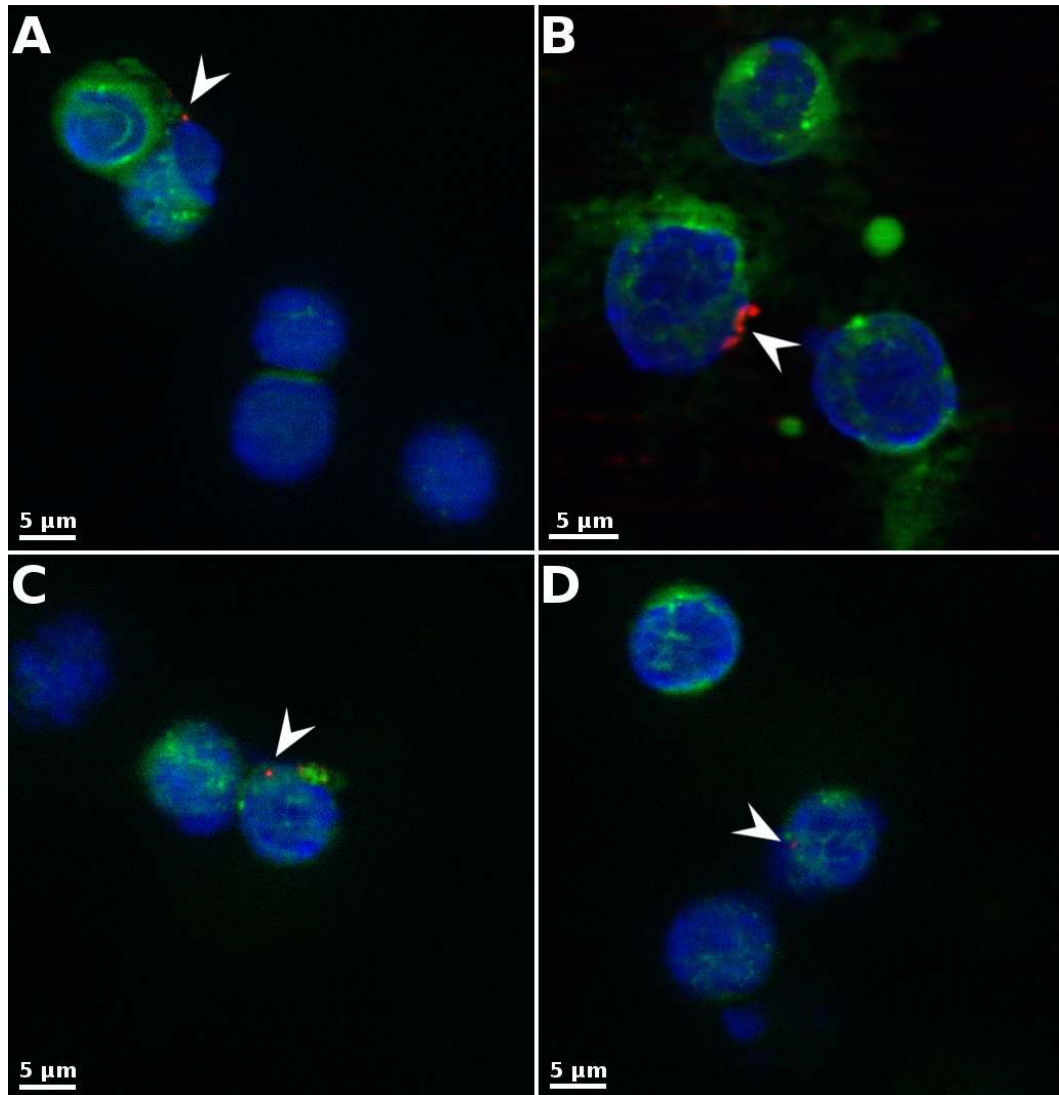


FIGURE IV-2 – Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) detection of *Wolbachia* in circulating hemocytes of the “predators” *Porcellio d. dilatatus* and *Armadillidium vulgare* at 180 days post-ingestion. Hemocytes of “predators” belonging to both species were collecting and pooled in order to confirmed qPCR results. Some hemocytes of *P. d. dilatatus* (A and B) and of *A. vulgare* (C and D) were infected by *Wolbachia* (3 and 8 % of infected hemocytes, respectively) (in red). A-D : *Wolbachia* in red, Actin in green, nuclei in blue.

way for the *Wolbachia* to avoid extinction is to jump from one host to another. This ability has been suspected since co-phylogenetic analyses show incongruence (Werren *et al.* 2008). These horizontal transmissions would thus play an important role in the wide distribution of this endosymbiont among the arthropods in all ecosystems (Cordaux *et al.* 2001 ; McMeniman *et al.* 2008 ; Vavre *et al.* 1999 ; Zug *et al.* 2012). However, the ecological mechanisms that are involved in horizontal transmissions between hosts remain largely unknown (Werren *et al.* 2008). Evidence was found for only two possible ecological paths, via hemolymph contact (Rigaud & Juchault 1995) and upon the development of parasitic larvae within infected hosts (Heath *et al.* 1999).

Predation, though a brief interaction between living individuals of two species, is used by many parasites that require horizontal transmission from one host to another to achieve their life cycle (Combes 1995). The cannibalism which is one peculiar case of predation that occurs between individuals belonging to the same species can also lead to parasite horizontal transmission (Khan 1981). The horizontal transmission of *Wolbachia* by the predation route was tested as unsuccessful in few studies (Enigl *et al.* 2005 ; Hurst *et al.* 2012). Phylogenetic analyses of the *Wolbachia* infecting spiders and their preys in the same ecosystem also indicated that *Wolbachia* would not easily navigate in this food web (Yun *et al.* 2011). On another note, some Endosymbiont Based Control Strategies rely on the principle that upon introduction into a new host and release in the environment, *Wolbachia* will not escape and spread along the food chain through predators. Indeed, when artificially introduced into the mosquito *Aedes aegypti*, the *Wolbachia* strain *wMelPop*, was not found in the five natural predator species tested after preying on larvae or adults (Hurst *et al.* 2012). However, there was one case where predators became *Wolbachia* positive, when *Phytoseiulus persimilis* mites were experimentally fed with symbiotic larvae of the spider mite *Tetranychus urticae* (Enigl *et al.* 2005). But actually, the *Wolbachia* were restricted to the predator gut : starvation sufficed to erase all trace of infection.

Woodlice are convenient models to test whether predation and cannibalism can be an ecological route for the horizontal transfer of *Wolbachia* because (i) they are widely infected by *Wolbachia* (Cordaux *et al.* 2012), and (ii) their main diet is to be detritivorous though they can easily turn into herbivores (Farmer & Dubugnon 2009) or even carnivores. They could prey on other woodlice from the same species or from another species, especially during social interactions (Warburg *et al.* 1984). The probability to get eaten by congenetics or conspecifics increases for woodlice which are very weak, for example being injured or in the middle of a molting period (Pokarzhevskii *et al.* 2003). After ingestion of an *A. vulgare* “prey”, we detected the *wVulC* *Wolbachia* strain into the two different “predator” species with higher titers in the native host *A. vulgare* than in the foreign one *P. d. dilatatus*. This indicates for the first time that some *Wolbachia* were able to resist to the digestive process, to pass through the intestine barrier and to infect the tested tissues (i.e., ovaries, central nervous system (CNS), and hemocytes). The efficiency of such a transfer was very high since 100 % of the “predators” of both species were infected by *wVulC*, even if all their tested tissues were not always infected at 180 days PI. However, the *wVulC* titers for all the tested tissues were very low compared to those obtained in naturally infected *A. vulgare* or after a transfection by injection of crushed ovaries in *P. d. dilatatus* (Le Clec’h *et al.* 2012). Moreover, the infection rates did not increase between 90 and 180 days after ingestion suggesting a very low or no multiplication. It could be that due to the stress generated by the environment of the digestive tract, the *Wolbachia* switched to a form that does not multiply or does so at a very low rate. A first hypothesis to further explain this pattern is that only very few *Wolbachia* variants were able to cross the intestine wall and then multiplied to reach only a low density in the host. Thus the strong bottleneck would have selected for the *Wolbachia* that are more resistant while exhibiting lower multiplication rates, according to the growth / survival trade-off (Aertsen & Michiels 2004). A second hypothesis is that many more bacteria survived the intestine, crossed the wall and colonized the tissues

as a “dormant form” that slowly decayed over months. The ability of the *Wolbachia* to produce “dormant forms” has not been described yet. However, it has been previously shown that the *Wolbachia* (i) exhibit different morphology some being close to that of spores (Juchault & Mocquard 1988 ; Juchault *et al.* 1980 ; Min & Benzer 1997 ; Zhukova & Kiseleva 2012), and (ii) are able to survive in an extracellular manner for at least one week (Rasgon *et al.* 2006 ; Rigaud *et al.* 1991). At 180 days PI, we observed tissues of some individuals without *Wolbachia* infection : Ovaries of some *P. d. dilatatus* and ovaries, CNS and hemocytes of some *A. vulgare*. Even if we cannot exclude that these tissues were never infected, as all the tissues were infected in all animals tested at 90 days PI, we rather suspect the elimination of the bacteria by host reactions such as autophagy or apoptosis that are known to be involved in the elimination of *Wolbachia* from host cells (Le Clec’h *et al.* 2012 ; Voronin *et al.* 2012 ; Zhukova & Kiseleva 2012). Even if we detected *Wolbachia* in the ovaries at both 90 and 180 days PI at least for *P. d. dilatatus*, the density was so low that it would prevent vertical transmission. However, this titer might increase if predation is a recurring behaviour that allows accumulation of *Wolbachia* in a host or if some individuals are more susceptible to these bacteria. Therefore, we might hypothesize that in some case some *Wolbachia* find their way to the progenies of females having received these *Wolbachia* via predation.

Among all the tissues tested, the CNS presented an interesting pattern : The infection was low but seemed to be stable until 180 days PI in both species. Whatever the transinfection mode (i.e., injection or ingestion), the *wVulC* strain seemed to colonize the CNS in a more extensive way than the other tissues (Le Clec’h *et al.* 2012). This tissue seems to constitute a kind of reservoir for the *Wolbachia* may be because nerve cells are less regularly renewed compared to hemocytes and oocytes. However, in the nerve cells of individuals infected by the predation route, the infection was stable but low and did not trigger the pathogenic phenotype described in *P. d. dilatatus* injected with *wVulC* from *A. vulgare* ovaries (Le Clec’h *et al.* 2012).

The establishment of *Wolbachia* in new host species requires crossing three filters : The ecological filter, the physiological filter, and the population filter (Hurst *et al.* 2012 ; Riegler *et al.* 2004). The ecological filter can be potentially opened through many ecological interactions. We highlight here that because of the gregarious behaviour and the overlapping communities of woodlice the chance for cannibalism is quite high. We demonstrate that ingested *Wolbachia* cross the physiological filter, at least transiently, since the bacteria can settle in all the tested tissues including the ovaries, the tissue where vertical transmission takes place. However, the *Wolbachia* spreading in the host population after such a horizontal transfer by predation would require an increase of bacterial load to reach *Wolbachia* densities similar to those found in animals from the same species that are able to vertically transmit the symbionts to their offspring.

1.4.1 Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ADaWOL ANR-09-JCJC-0109-01 coordinated by Dr Mathieu Sicard). Winka Le Clec'h was supported by a grant from Région Poitou-charentes.

2 Conclusion

Très largement infectés par *Wolbachia* (Cordaux *et al.* 2012), pouvant s'avérer prédateurs (Edney *et al.* 1974 ; Pokarzhevskii *et al.* 2003) et de nature grégaire (Warburg *et al.* 1984), les isopodes terrestres constituent de très bons modèles biologiques permettant de tester si la voie trophique peut s'avérer être une voie de transfert horizontal pour *Wolbachia*. Au cours de cette étude, nous avons détecté la présence de *Wolbachia* dans tous les tissus testés (i.e., ovaires, système nerveux central (SNC) et hémocytes) chez tous nos "prédateurs" (i.e., *A. vulgare* et *P. d. dilatatus*) initialement non-infectés par *Wolbachia*. La présence de l'endosymbiote a été confirmée en hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) au sein des hémocytes des deux espèces prédatrices. Cependant, les densités bactériennes mesurées dans les différents tissus sont faibles comparées à celles obtenues chez les hôtes natifs *A. vulgare* ou après injection chez l'hôte distant *P. d. dilatatus* (Le Clec'h *et al.* 2012). Néanmoins, les *A. vulgare* "cannibales" se retrouvent infectés en proportion plus importante que les *P. d. dilatatus* "prédateurs", ce qui indique que les transferts à l'échelle intra-spécifiques mènent à une colonisation plus intense que ceux survenant au niveau inter-spécifique. Cette infection après prédation, bien qu'effective, semble relativement instable puisqu'entre 90 et 180 jours après ingestion de la proie porteuse de *Wolbachia*, les densités bactériennes diminuent dans les ovaires et les hémocytes des prédateurs. Seul le SNC présente des densités de *Wolbachia* peu variables, bien que relativement basses. Une question reste totalement ouverte : Les *Wolbachia* quantifiées sont-elles les mêmes que celles étant passées de la proie au prédateur via le système digestif de ce dernier ? Si tel était le cas, il faudrait supposer que les *Wolbachia* aient survécu plusieurs mois sous une forme de dormance voire de résistance qui leur aurait permis de supporter les conditions physiologiques rencontrées dans le tube digestif. Reste le problème de la migration de ces formes de résistance : il paraît difficile d'imaginer des bactéries en phase de dormance migrer à travers les tissus. A l'heure actuelle, très peu d'informations relatives à la durée de

vie des *Wolbachia* sont disponibles, notamment lors de situations extrêmes bien que Rasgon *et al.* (2006) aient montré qu'elles pouvaient survivre et rester infectieuses après sept jours de vie extracellulaire au sein d'un milieu de survie. Nous savons également que ces endosymbiotes peuvent survivre plusieurs jours dans un broyat d'ovaires. Par ailleurs, chez les cloportes et les drosophiles, des formes particulières de *Wolbachia*, semblables à des spores, ont été décrites dans certaines situations de stress, notamment environnemental (Juchault & Mocquard 1988 ; Juchault *et al.* 1980 ; Min & Benzer 1997 ; Zhukova & Kiseleva 2012). On pourrait donc imaginer que certaines *Wolbachia* soient capables de passer dans un état de résistance au milieu extracellulaire lors de leur trajet au sein du tube digestif. Cette forme de résistance serait capable de s'établir dans les cellules hôtes mais ne pourrait s'y multiplier. Elles finiraient par mourir et être éliminées par des mécanismes utilisés dans la lutte contre les bactéries endocellulaires tels que l'apoptose, l'autophagie etc (Le Clec'h *et al.* 2012 ; Voronin *et al.* 2012 ; Zhukova & Kiseleva 2012). Cependant, il peut sembler peu réaliste de penser que les *Wolbachia* survivent si longtemps (tout de même 6 mois !) même sous une forme de résistance. Dans ce cas, il faut envisager une multiplication très lente qui ne permettrait pas d'atteindre les niveaux détectés chez les individus injectés à partir de broyats d'ovaires ou ayant reçu les symbiotes verticalement. On peut alors proposer des hypothèses expliquant les faibles densités de *Wolbachia* rencontrées. Ainsi, le passage dans le milieu *a priori* hostile qu'est le tube digestif d'un cloporte constituerait, pour ces endosymbiotes, un fort goulot d'étranglement. Les quelques *Wolbachia* qui passeraient ce goulot seraient celles qui auraient résisté le mieux à ce stress environnemental mais également potentiellement celles qui se multiplieraient le moins dans les tissus hôtes du fait d'un compromis entre multiplication et survie précédemment décrit chez certaines bactéries (Aertsen & Michiels 2004).

Parmi tous les tissus testés, le SNC présente un patron de colonisation particulièrement intéressant puisqu'il est le plus colonisé et ceci de manière stable. Ce

tissu pourrait être une sorte de réservoir pour *Wolbachia*, comme c'est le cas chez de nombreux virus (i.e., herpès, varicelle) ou parasites (i.e., toxoplasme) en raison de son taux de renouvellement cellulaire plus faible que les ovocytes ou hémocytes. Dans le cas présent, les densités très faibles de *Wolbachia* ne semblent pas induire d'importantes réactions autophagiques du tissu nerveux d'où l'absence de virulence, contrairement à celles rencontrées lors de l'injection de la souche *wVulC* chez *P. d. dilatatus* (Le Clec'h *et al.* 2012).

Bien que la présence des *Wolbachia* ait été détectée dans les ovaires, les taux d'infection semblent trop faibles pour permettre une transmission verticale, même si cela n'a pas été testé. Néanmoins, si la prédation ou le cannibalisme est fréquent, il se peut que l'infection des "prédateurs" augmente par accumulation et qu'une transmission verticale de *Wolbachia* soit alors possible, donnant naissance à une nouvelle interaction durable.

L'interaction durable entre *Wolbachia* et son nouvel hôte requiert le passage de trois filtres : le filtre écologique, le filtre de compatibilité (ou physiologique) et le filtre de transmission qui permet l'accès à l'échelle populationnelle (Hurst *et al.* 2012 ; Riegler *et al.* 2004). Le filtre écologique peut être ouvert au gré des interactions entre organismes, en particulier chez les crustacés terrestres, espèces grégaires dont les habitats peuvent se chevaucher. Dans le cas d'une ingestion, nous avons démontré dans cette étude que le filtre physiologique pouvait être au moins partiellement ouvert, permettant aux *Wolbachia* (éventuellement sous une forme résistante), d'atteindre tous les tissus, y compris les ovaires assurant la transmission verticale. Néanmoins, si les *Wolbachia* parviennent à coloniser les ovaires, les densités bactériennes très faibles apparaissent comme un frein important à la dispersion de ces symbiotes au sein des populations.

Cinquième partie

Evolution expérimentale de
Wolbachia où comment devenir
pathogène pour son hôte natif.

1 Introduction

Le mode de transmission constitue l'un des éléments clés de l'évolution de la virulence au sein des symbioses (Ewald 1987 ; Stewart *et al.* 2005). Ainsi, il est théoriquement prédit que la transmission verticale, de par le lien qu'elle entraîne entre reproduction de l'hôte et dispersion du symbiote, doit mener à une atténuation de la virulence voire à la sélection de facteurs mutualistes (Kakehashi 1996). Cependant, même si cette tendance est respectée dans une majorité de systèmes biologiques, toutes les symbioses transmises verticalement n'évoluent pas en relations mutualistes. Ainsi, chez les *Wolbachia* et d'autres symbiotes (*Arsenophonus*, *Cardinium*, *Spiroplasma* etc.) une des voies également explorées est celle du « parasitisme du sexe » (Duron *et al.* 2008). Ces symbiotes manipulent la reproduction de leurs hôtes dans la mesure où cela augmente leur transmission (Werren *et al.* 2008). Dans le cas des symbioses transmises horizontalement on s'attend au maintien de coûts plus importants à la vue des liens existant entre multiplication et transmission d'une part et multiplication et virulence d'autre part (Lipsitch *et al.* 1996 ; Stewart *et al.* 2005). Ainsi, un symbiote potentiellement plus virulent va se multiplier beaucoup et donc mieux se transmettre (Ewald 1993 ; Myer & Rothman 1995). Une situation de transmission horizontale peut ainsi mener à une course aux armements (Combes 1995 ; van Valen 1973) et une escalade dans la virulence du symbiote face à une escalade dans la résistance de l'hôte (Combes 1995). Cependant, des cas de symbioses mutualistes transmises horizontalement sont également décrits entre des invertébrés marins et leurs algues symbiotiques (Trench 1993), le tube digestif des mammifères et leur faune microbienne (Dethlefsen *et al.* 2007 ; Savage 1977), des plantes légumineuses et les bactéries du genre *Rhizobia*, ces dernières assurant la fixation de l'azote atmosphérique (Sprent *et al.* 1987) et également entre des seiches et leurs symbiotes *Vibrio fischeri* (Ruby 1996). Ces *Vibrio* via leur activité bioluminescente assurent aux seiches une forme de camouflage : en faisant disparaître leur ombre portée sur les fonds marins, elle deviennent moins visibles pour leurs préda-

teurs (Nyholm & McFall-Ngai 2004). Dans les interactions mutualistes, les bénéfices réciproques ne sont pas les seuls garants de la stabilité des symbioses puisque l'on assiste à la sélection de compromis qui contribuent à stabiliser l'association, et qui sanctionnent le maintien de symbiotes « tricheur » (Sachs *et al.* 2004 ; Simms *et al.* 2006). Ces processus de sanction du « tricheur » interviennent chez la plante *Lotus strigosus* lorsque ses symbiotes *Bradyrhizobium* n'assurent plus la fixation d'azote (Sachs *et al.* 2010) ainsi que chez les seiches qui vont exclure les mutants de *Vibrio* tricheurs ayant perdu leur capacité à produire de la lumière (McFall-Ngai *et al.* 2012).

L'étude de la nature des interactions entre un symbiote et son hôte dans différents contextes (e.g., changement d'environnement) et des mécanismes impliqués dans ces interactions peut se faire grâce à une approche par mutation du symbiote. Ainsi, pour toutes les bactéries cultivables, il est possible de muter un ou plusieurs gènes puis de visualiser l'impact du ou des mutant(s) sur l'interaction afin d'identifier les gènes impliqués dans la relation mutualiste ou parasitaire (Steinert *et al.* 2000). Cette approche est celle employée pour les symbiotes *Xenorhabdus*, à la fois mutualistes des nématodes *Steinernema* (Sicard *et al.* 2003) et parasites d'insectes ou encore chez les *Vibrio* vivant en symbiose avec des seiches (Yip *et al.* 2006). Cependant, cette technique nécessite que les bactéries étudiées soient cultivables et qu'elles montrent une relative indépendance vis-à-vis de l'hôte : ceci n'est pas le cas des endocytobiotés tels que les symbiotes primaires nutritifs (SPE, *Buchnera* etc.) et les symbiotes secondaires comme *Wolbachia*, *Cardinium* etc. L'évolution expérimentale est une approche qui ne consiste pas à éteindre l'expression d'un gène puis d'en évaluer les conséquences sur les phénotypes, mais au contraire de modifier les pressions de sélection s'exerçant sur le symbiote afin d'en suivre la réponse (Garland & Kelly 2006). C'est donc une approche complémentaire pour les symbiotes cultivables et alternative pour les symbiotes non cultivables. La sélection expérimentale est un outil très puissant puisqu'elle permet de tester des hypothèses, de

voir l'évolution se dérouler et potentiellement de décrypter les causes moléculaires des changements qui se produisent. Ainsi, dans des systèmes mixtes où transmission verticale et horizontale sont possibles, le fait de favoriser une des voies peut totalement modifier la trajectoire évolutive de la virulence (Bull *et al.* 1991 ; Magalon *et al.* 2010 ; Messenger *et al.* 1999). Bull *et al.* (1991) ont ainsi démontré, dans le cas d'une association entre une bactérie et son phage, que lorsque la transmission verticale du phage est favorisée, sa virulence diminue fortement. En revanche, la sélection de phages via la transmission horizontale entraîne l'évolution de ceux-ci vers une virulence plus importante. Autre exemple illustrant ce propos, le cas du protozoaire *Paramecium caudatum* et de sa bactérie parasite *Holospora undulata*. Pour réduire la part de la transmission horizontale et augmenter celle de la transmission verticale dans l'évolution de la virulence, Magalon *et al.* (2010) ont effectué à chaque passage, des dilutions sérielles des populations de Paramécies. Dans les populations diluées, la virulence bactérienne est bien moins intense que dans celle de populations non-diluées. En effet, lorsque la taille de la population est maintenue à un taux proche d'une taille de population critique pour l'environnement, la transmission des bactéries est alors essentiellement horizontale et leur virulence est forte. Ces études ont permis de confirmer par des approches expérimentales, les attendus théoriques de l'impact des modes de transmission sur la virulence des symbiotes.

Se révélant être d'une étonnante plasticité, les *Wolbachia* sont ainsi capables d'infecter de nombreux hôtes, parfois phylogénétiquement éloignés de leurs hôtes natifs lors de transferts horizontaux inter-spécifiques [(Cordaux *et al.* 2001 ; Rigaud & Juchault 1995 ; Rigaud *et al.* 2001), Le Clec'h *et al.*, *in review pour publication dans Evolution*]. Néanmoins, certains de ces transferts horizontaux sont accompagnés d'importants changements des niveaux de virulence de *Wolbachia* vis-à-vis de son nouvel hôte. Parmi les souches de *Wolbachia* conduisant à une interaction de type hôte / pathogène en cas de transfert horizontal, la souche *wVulC* provenant d'*A. vulgare* s'est, tout au long des différents travaux de cette thèse, illustrée comme

particulièrement virulente. La nature même de la relation entre *wVulC* et son hôte natif au sein duquel elle est verticalement transmise aboutit à des conflits importants sans pour autant que l'on puisse la qualifier de réellement pathogène. Au cours de l'évolution entre un hôte et son symbiote, le compromis transmission / virulence tend à mener à la sélection d'une virulence optimale du symbiote permettant à la fois la multiplication dans l'hôte (facette virulence) sans pour autant que la mortalité de l'hôte soit une entrave à la transmission (facette transmission) (Mackinnon & Read 1999). La levée artificielle des pressions de sélection naturelle s'exerçant sur ce compromis via l'approche d'évolution expérimentale (consistant à changer le mode de transmission du symbiote), nous a permis d'étudier l'évolution de la virulence de *Wolbachia* sous la contrainte unique de la transmission horizontale. Nous avons pour cela utilisé la souche *wVulC* de *Wolbachia* qui est maternellement héritée dans les populations d'*A. vulgare*. Nous avons vu précédemment que cette souche colonise tous les tissus de son hôte, y compris les hémocytes et que ces cellules immunitaires peuvent jouer un rôle dans la transmission horizontale naturelle des *Wolbachia* (Rigaud & Juchault 1995). Au cours de cette expérience d'évolution expérimentale, nous avons contraint la transmission horizontale de *wVulC*, en inoculant *Wolbachia* lors de chacun des passages à de nouveaux pools d'individus asymbiotiques via l'hémolymphe contaminée provenant des animaux du transfert précédent. Ce protocole d'évolution expérimentale nous a ainsi permis d'analyser (i) l'évolution de la virulence de *Wolbachia* lorsque ces symbiotes ne sont plus soumis au même type de compromis de transmission / virulence et enfin (ii) le lien existant entre densité de *Wolbachia* et virulence.

2 Mise en place de l'évolution expérimentale

Dans un premier temps, nous avons infecté des femelles *A. vulgare* dépourvues de *Wolbachia* (lignée de laboratoire provenant d'Héraklion en Grèce) âgées d'un an

(Figure V-1). Cette première infection (ou transfert 0) a été effectuée avec un broyat d'ovaires (cf. Partie Matériels et méthodes) issus de femelles *A. vulgare* infectées par la souche *wVulC* (lignée de laboratoire provenant d'Helsingor au Danemark), également âgées d'un an. Trois lots indépendants de 5 femelles (i.e., lignées A, B, C) ont été infectés puis gardés 30 jours en élevage. L'hémolymph de ces femelles a servi à infecter les suivantes qui ont été gardées 45 jours en élevage puis sacrifiées afin de permettre l'infection d'autres femelles et ce jusqu'au transfert 8. Un lot contrôle a été réalisé à partir du même protocole expérimental mais la première injection (t0) a été effectuée à partir d'un broyat d'ovaires de femelles non-infectées par *Wolbachia*. En totalité, 315 femelles ont été utilisées au cours de cette évolution expérimentale (i.e., 5 femelles asymbiotiques par lignée du transfert t0 à t4 puis 20 femelles asymbiotiques par lignée du transfert t5 à t8). Lors de chaque transfert, la mortalité des hôtes infectés a été suivie et les densités de *Wolbachia* présentes dans les organes (i.e., ovaires, chaîne nerveuse et hémocytes) prélevés chez les femelles sacrifiées ont été quantifiées à l'aide de la PCR quantitative (cf. Partie Matériels et méthodes). En parallèle, une hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a été réalisée sur les hémocytes prélevés dans le but de déterminer les taux de colonisation de ces cellules immunitaires utilisées comme vecteurs de *Wolbachia* au cours de l'évolution expérimentale (cf. Partie Matériels et méthodes). Enfin, une analyse des communautés bactériennes présentes dans l'hémolymph collectée sur les femelles infectées a été effectuée, lors de chaque transfert expérimental, par TGGE [Temperature Gradient Gel Electrophoresis, cf. Chapitre Matériels et méthodes ; en collaboration avec Jessica Dittmer (Thèse encadrée par D. Bouchon et M. Johnson)].

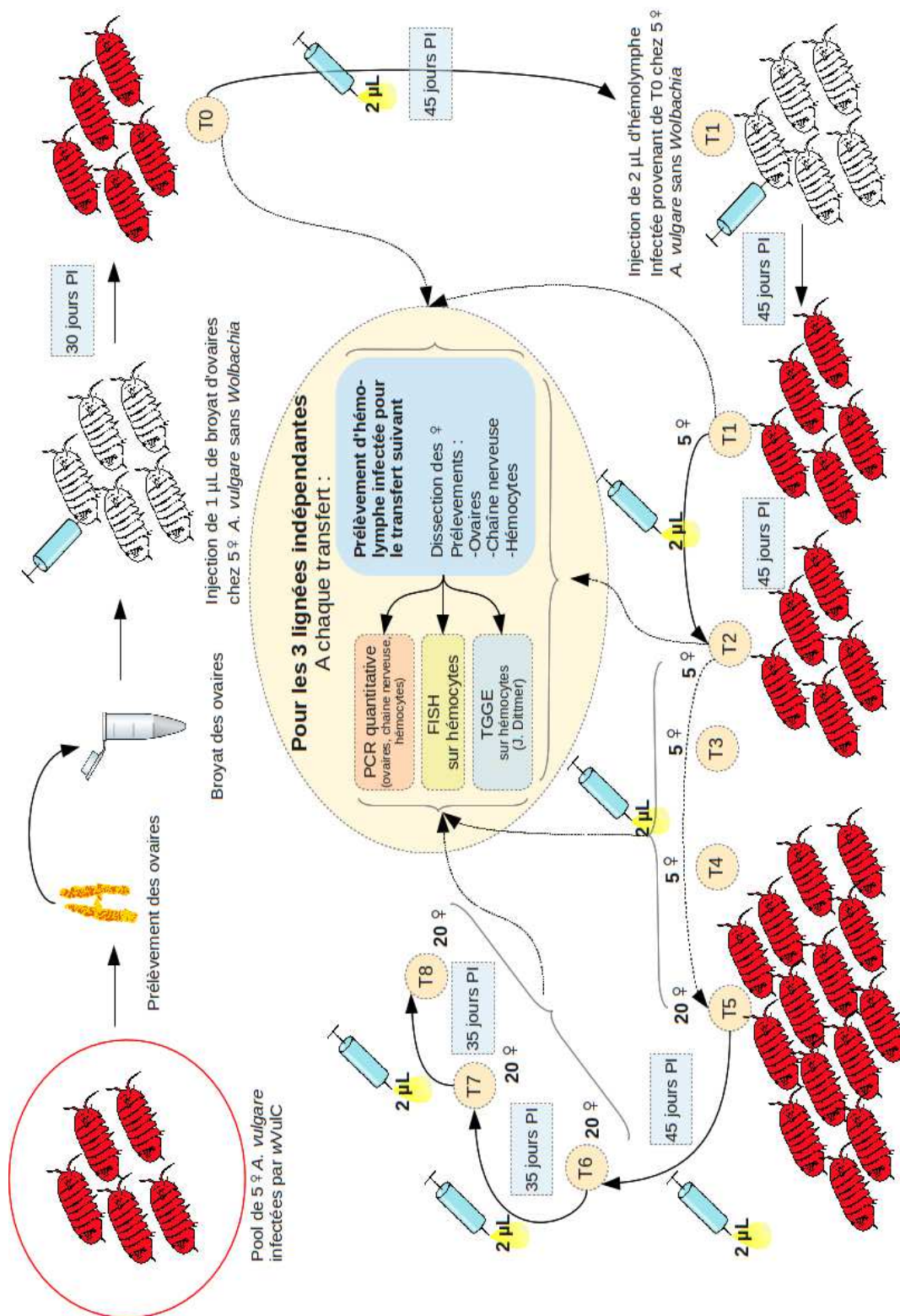


FIGURE V-1 – Schématisation du protocole d'évolution expérimentale de la souche de *Wolbachia wVulC* chez son hôte natif *A. vulgare*.

3 Résultats

3.1 Densités de *Wolbachia* présentes dans les tissus des hôtes au cours de l'évolution expérimentale

Les densités de *Wolbachia* présentes dans les tissus (i.e., hémocytes, chaîne nerveuse et ovaires) ont été déterminées en PCR quantitative, pour chacune des lignées créées et à chaque passage expérimental. L'analyse de ces densités porte essentiellement sur les transferts allant de t0 à t5 puisque suite au transfert t5, la mortalité des individus infectés s'avère très forte. De ce fait, à partir du transfert t6 la sélection va porter sur des animaux ayant été moins infectés ou ayant mieux résistés à l'infection par *Wolbachia*, ce qui ne reflète pas, *a priori*, les densités bactériennes qui auraient pu être quantifiées au sein des tissus des autres animaux infectés. Concernant les hémocytes, cellules utilisées dans cette évolution expérimentale comme vecteur de la transmission contagieuse, les résultats montrent une différence dans le nombre de *Wolbachia*/ng d'ADN au cours des transferts (Kruskal-Wallis ; $W=19,8836$; $ddl=8$; $p=0,0107$; Figure V-2 A). Entre le transfert t0 (où les animaux asymbiotiques sont infectés via un broyat d'ovaires) et le transfert t5 (correspondant au nombre le plus élevé de *Wolbachia* rencontré dans ce tissu au cours de cette évolution expérimentale, Figure V-2 A) les densités de *Wolbachia* présentes dans les hémocytes sont en moyenne multipliées par 2544 fois (Régression linéaire entre t0 et t5 : $R^2=39\%$; $p=0,0032$). En revanche, nous ne mettons pas en évidence de différence entre les densités de *Wolbachia* quantifiées au sein des trois lignées expérimentales indépendantes (Kruskal-Wallis ; $W=0,0988$; $ddl=2$; $p=0,9519$). Une différence dans les densités de *Wolbachia* dans la chaîne nerveuse est également révélée par les analyses statistiques entre t0 et t5 (Kruskal-Wallis ; $W=61,5484$; $ddl=8$; $p<0,0001$; Figure V-2 B) et ce de manière identique dans les trois réplicats (Kruskal-Wallis ; $W=1,3966$; $ddl=2$; $p=0,4974$). Entre les transferts t0 et t5, le nombre de *Wolbachia*/ng d'ADN au sein du tissu nerveux a été multiplié par 45 (Régression

linéaire entre t0 et t5 : $R^2=38\%$; $p= <0,0001$), soit tout de même 57 fois moins que pour les hémocytes au cours des mêmes passages expérimentaux. Ces résultats mettent en lumière une importante augmentation du nombre de *Wolbachia*/ng d'ADN pour les échantillons d'hémocytes et de chaîne nerveuse, en particulier entre t0 et t5. Par la suite, au cours des passages t6 à t8, dans l'hémolymph et dans le système nerveux, les taux décroissent. La "dose moyenne" (i.e., le taux de *Wolbachia* quantifié au sein des hémocytes permettant d'infecter les animaux asymbiotiques du transfert suivant) devient similaire à celle injectée lors du transfert t4. Au sein des ovaires, tissu assurant la transmission verticale des *Wolbachia*, les taux mesurés sont plus faibles que dans les autres tissus testés. Dans cet organe, le nombre de *Wolbachia*/ng d'ADN est particulièrement fluctuant en fonction des transferts et ce de manière similaire dans les trois réplicats (Kruskal-Wallis ; $W= 0,2853$; $ddl= 2$; $p= 0,8670$; Figure V-2 C). Par ailleurs, les analyses ne montrent aucune corrélation entre les densités de *Wolbachia* lors des différents passages expérimentaux (Régression linéaire entre t0 et t5 : $R^2=0,0079\%$; $p= 0,5321$).

3.2 Augmentation du nombre d'hémocytes infectés au cours des transferts expérimentaux

L'augmentation des densités globales de *Wolbachia* dans les hémocytes entre les transferts t0 et t5 montrés en PCRq a été illustrée et confirmée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), permettant de quantifier le nombre d'hémocytes infectés. Au cours des différents transferts horizontaux, la proportion d'hémocytes infectés est fortement différente (Kruskal-Wallis ; $W= 229,0614$; $ddl= 8$; $p= <0,0001$; test post-hoc de Nemenyi ; Figure V-3) et varie de manière similaire pour les trois réplicats (Kruskal-Wallis ; $W= 0,3976$ $ddl= 2$ $p= 0,8197$; Figure V-3), comme précédemment en PCRq. Après la première infection t0, réalisée par injection d'un broyat d'ovaire contenant *Wolbachia*, la proportion d'hémocytes infectés était d'environ 15 %. Suite au premier transfert réalisé avec de l'hémolymph (collectée

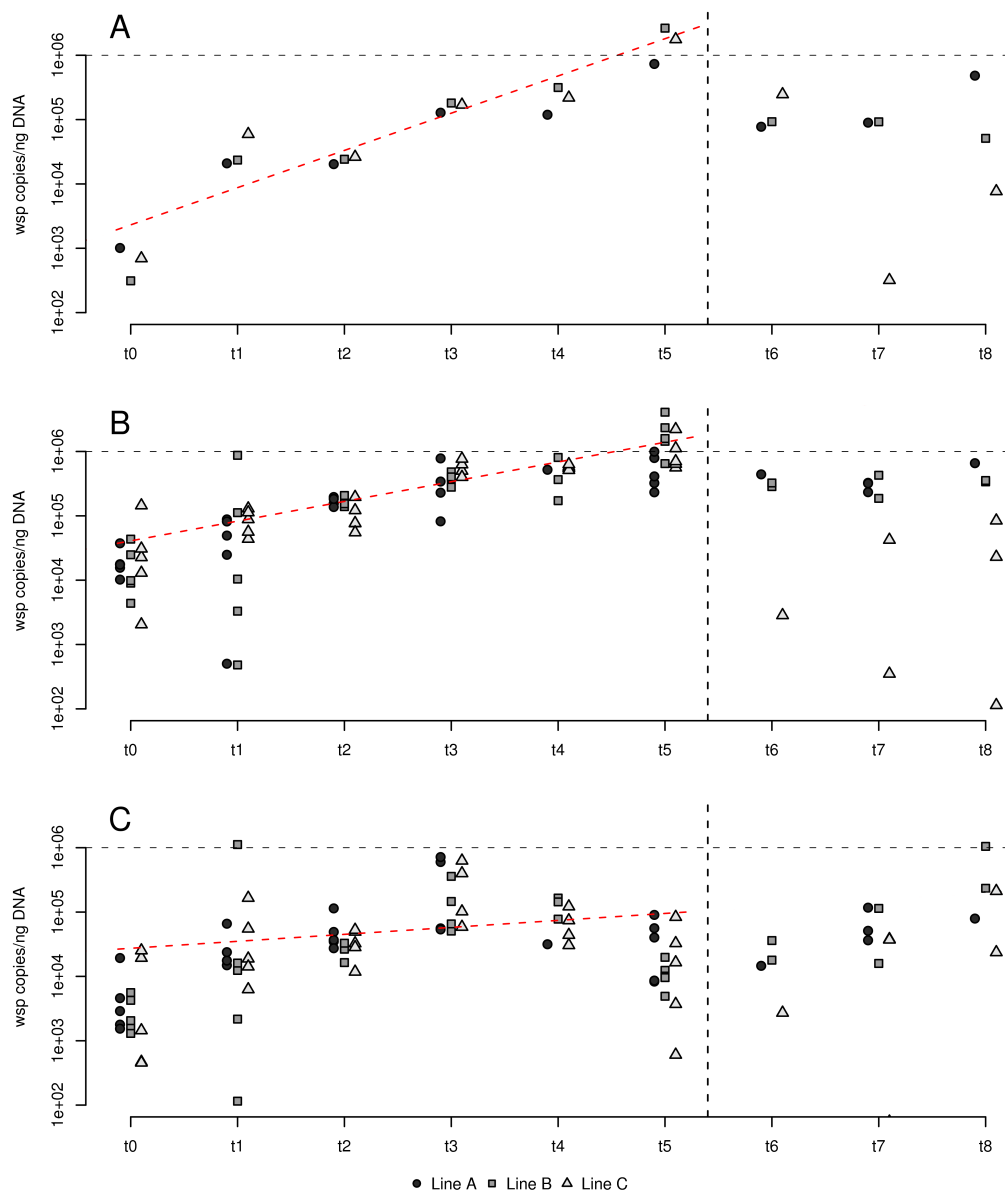


FIGURE V-2 – Quantification bactérienne dans les hémocytes, la chaîne nerveuse et les ovaires, pour chaque lignée expérimentale lors de chacun des transferts. La quantification en PCRq met en évidence une augmentation du nombre de *Wolbachia*/ng d'ADN, principalement pour les hémocytes (A) entre les transferts t0 à t5. Après le transfert 5, ce nombre diminue jusqu'à atteindre les niveaux observés pour le transfert 4. L'augmentation du nombre de *Wolbachia*/ng d'ADN est aussi visible pour la chaîne nerveuse (B) avec un patron de distribution proche de celui observé dans les hémocytes. La situation est différente dans les ovaires où les taux de *Wolbachia* sont beaucoup plus fluctuants et ne montrent pas d'augmentation directionnelle (C) (— : régression linéaire entre t0 et t5; la ligne verticale pointillée entre les transferts t5 et t6 représente le moment à partir duquel les taux quantifiés sont biaisés en raison de l'importante mortalité des individus dans chaque lignée)

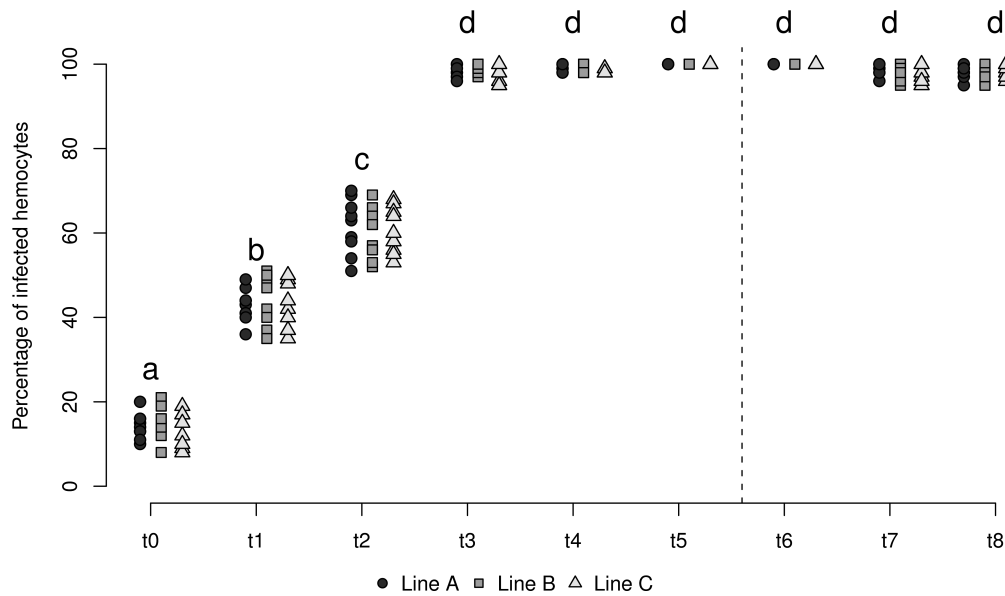


FIGURE V-3 – Pourcentage d'hémocytes infectés par *Wolbachia* pour chacune des lignées et transferts expérimentaux. Suite à la détection des *Wolbachia* via l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), il a été possible de déterminer le pourcentage d'hémocytes infectés. Ce nombre augmente rapidement et à partir du transfert 3, la majeure partie des cellules sont infectées (tous les hémocytes le sont pour les transferts t5 et t6, puis ce pourcentage décroît faiblement pour les transferts t7 et t8). (La ligne verticale pointillée entre les transferts t5 et t6 représente le moment à partir duquel les taux quantifiés sont biaisés en raison de l'importante mortalité des individus dans chaque lignée)

sur les animaux infectés lors du t0), le nombre d'hémocytes colonisés a augmenté pour atteindre 43 % (Figure V-4 A). Ce taux étant proche de celui de 38 % observé chez les hôtes naturellement infectés (Chevalier *et al.* 2011). Après le transfert t2, le nombre d'hémocytes colonisés était d'en moyenne de 61 % (Figure V-4 B). A partir du transfert t3 jusqu'au t8, le nombre moyen d'hémocytes infectés oscillait entre 98 % et 100 % (pour les transferts t5 et t6), avec de nombreux hémocytes dont le cytoplasme étaient quasi totalement remplis de *Wolbachia* (Figure V-4 C et D). Contrairement à ce qui a pu être constaté avec les résultats de quantification de *Wolbachia* en PCRq, la diminution du nombre d'hémocytes infectés est ici très faible entre les transferts t6 et t8. Néanmoins, ces cellules présentaient, à l'observation, moins de *Wolbachia* au sein de leur cytoplasme que celles du transfert t5.

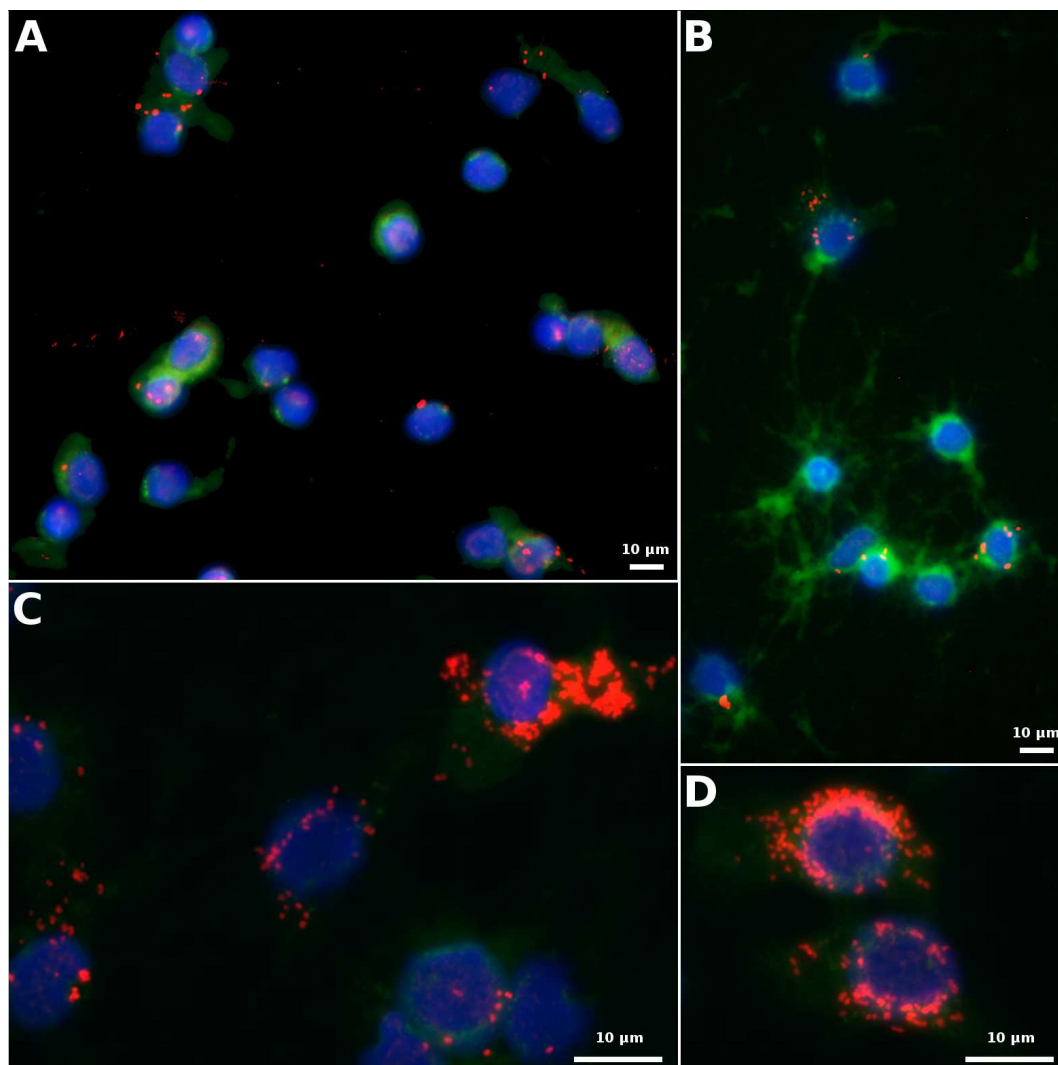


FIGURE V-4 – Détection des *Wolbachia* dans les hémocytes via l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) pour trois transferts expérimentaux (A : t1, B : t2 and C, D : t3). L'hybridation *in situ* en fluorescence permet le marquage des *Wolbachia* (en rouge, dans les hémocytes), de l'actine du cytosquelette (en vert) et du noyau (en bleu). Cette technique permet de mettre en évidence l'augmentation du nombre d'hémocytes infectés entre les transferts t1 (A), t2 (B) et t3 (D,E) mais aussi celle du nombre de *Wolbachia* au sein même d'un hémocyte, bien que la FISH ne soit pas quantitative (D, E).

3.3 Impact des ces transferts expérimentaux sur la survie des individus infectés

Au cours des transferts expérimentaux, la mortalité des individus transinfectés montre de fortes disparités (Kruskal-Wallis ; $W = 23,6900$; $ddl = 8$; $p = 0,0025$; Figure V-5 A) et ces résultats semblent corrélés à l'augmentation des densités de *Wolbachia* quantifiées dans les hémocytes (soit des doses bactériennes injectées ; Test de corrélation de Spearman : $S = 228,7788$; $\rho = 76,39\%$; $p = 0,0002$). D'une manière générale, les trois lignées expérimentales réagissent de manière très similaire (Kruskal-Wallis ; $W = 0,3932$; $ddl = 2$; $p = 0,8215$). Seules exceptions notées pour la lignée B au cours du transfert t2 et la lignée A lors du transfert t4. Le test post-hoc de Nemenyi permet de démontrer que la mortalité des hôtes transinfectés augmente après le transfert t5 pour ne plus diminuer (Figure V-5 A). Si la mortalité semblait liée à la "dose" injectée entre les transferts t0 jusqu'à t6 (i.e., la mortalité enregistrée pour le transfert t6 fait suite à l'injection d'une dose quantifiée plus importante à t5), elle ne l'est plus à partir des transferts t7 et t8. En effet, pour ces transferts, la dose injectée est bien moins forte, puisque similaire à celle inoculée lors du transfert t4 (Kruskal-Wallis ; $W = 3,5128$; $ddl = 3$; $p = 0,3191$), mais la mortalité ne diminue pas pour autant. Dans le but d'analyser de manière plus précise la mortalité des individus injectés entre les transferts t5 et t8 pour chacune des lignées, un plus grand nombre d'animaux a été transinfecté à chaque passage et la mortalité des animaux a été enregistrée chaque semaine et non plus seulement à la fin des 45 jours comme lors des passages précédents. Les courbes de survie, de même que les tests statistiques ne montrent pas de différence entre les lignées pour un même passage (Pour le t5 : ANOVA après un modèle de Cox ; $F = 0,9409$; $ddl = 2$; $p = 0,6247$; Figure V-5 B ; Pour le t7 : $F = 0,7193$; $ddl = 2$; $p = 0,6980$; Figure V-5 D ; Pour le t8 : $F = 0,8162$; $ddl = 2$; $p = 0,6649$; Figure V-5 E) excepté pour le transfert t6 (ANOVA après un modèle de Cox ; $F = 11,2100$; $ddl = 2$; $p = 0,0036$; Figure V-5 C) où les animaux de la lignée C meurent plus précocément que ceux des autres lignées (ANOVA après un

modèle de Cox lorsque la lignée C est retirée du jeu de données ; $F = 0,0010$; $ddl = 1$; $p = 0,9751$). Lors de chaque transfert d'hémolymph, les animaux transinfectés montrent une survie nettement plus faible que celle des individus appartenant à la lignée contrôle (Pour le t5 : ANOVA après un modèle de Cox ; $F = 10,0070$; $ddl = 3$; $p = 0,0185$; Figure V-5 B ; Pour le t6 : $F = 78,086$; $ddl = 3$; $p = <0,0001$; Figure 5C ; Pour le t7 : $F = 20,4620$; $ddl = 3$; $p = 0,0001$; Figure 4D ; Pour le t8 : $F = 51,9370$; $ddl = 3$; $p = <0,0001$; Figure 5E). Au fur et à mesure des transferts expérimentaux, la survie des animaux injectés décroît fortement et ces derniers meurent de plus en plus rapidement (Figure V-5 B à E). Les analyses statistiques révèlent que les animaux infectés lors du transfert t6 survivent moins longtemps que ceux injectés lors du t5 (ANOVA après un modèle de Cox ; $F = 40,658$; $ddl = 1$; $p = <0,0001$). Entre les transferts t6 et t7, la survie des individus injectés est similaire tandis que celle des animaux infectés lors du transfert 8 est significativement plus faible (ANOVA après un modèle de Cox ; $F = 4,1506$; $ddl = 1$; $p = 0,0416$). Par ailleurs, la mortalité rencontrée chez les individus appartenant à la lignée C injectés lors du t6 est similaire à celle retrouvée chez les animaux infectés lors du t8. Etant donné la rapidité de la mortalité des individus injectés et dans le but de conserver le plus longtemps possible les lignées sélectionnées (afin de garder les donneurs d'hémolymph en vie), nous avons dû réduire les temps d'incubation des bactéries dans les hôtes à 35 jours. Cependant, après le transfert t8, 35 jours post-injection, tous les animaux sont morts et les trois lignées expérimentales ont été définitivement perdues.

3.4 *Wolbachia* est-elle l'unique bactérie sélectionnée au cours de l'évolution expérimentale ?

Afin de savoir si les *Wolbachia* sont les uniques bactéries que nous avons sélectionnées via l'évolution expérimentale, une analyse des communautés bactériennes par TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) (cf. Partie Matériels et Méthodes) présentes dans l'hémolymph a été effectuée par J. Dittmer. Suite à l'am-

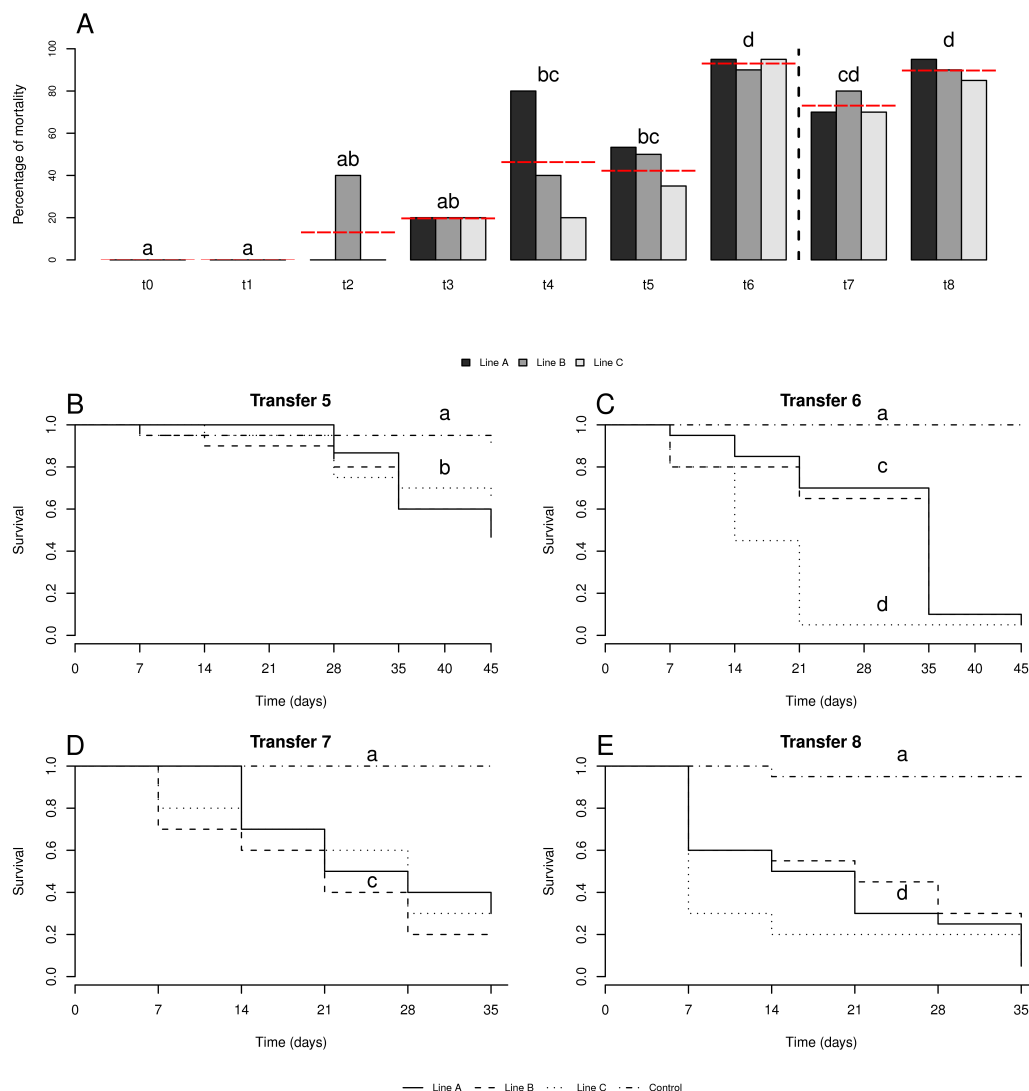


FIGURE V-5 – Impact des transferts expérimentaux sur la survie des *A. vulgare* infectés. (A) Le pourcentage global de mortalité, pour chacune des lignées augmente à chaque transfert en particulier lors des derniers passages expérimentaux (t6 à t8). Les courbes de survie (B, C, D et E) montrent la répartition ainsi que la rapidité de la mortalité pendant 45 jours post-injection pour les transferts t5 (B) et t6 (C) puis en 35 jours post-injection pour les transferts t7 (D) et t8 (E). La mortalité des individus est très importante et survient rapidement pour les deux derniers passages expérimentaux. Les souches de *Wolbachia* sélectionnées apparaissent comme de plus en plus pathogènes à chaque transfert. (— : moyenne des données pour les trois lignées, à chaque transfert expérimental ; la ligne verticale pointillée entre les transferts t6 et t7 représente le moment à partir duquel les doses de *Wolbachia* injectées (i.e., doses quantifiées dans les hémocytes au transfert t5) sont très élevées et induisent une importante mortalité dans toutes les lignées.

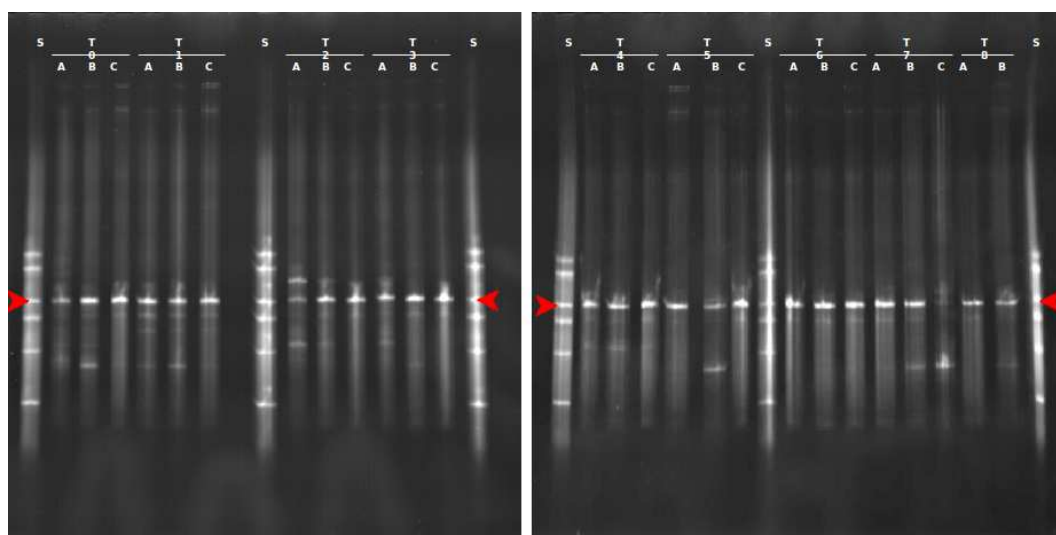


FIGURE V-6 – Gel d'électrophorèse réalisé sur gradient de température (TGGE) des échantillons ADN d'hémolymphe obtenus pour chacune des lignées et transferts expérimentaux. La migration sur gel des amplifiats obtenus pour les échantillons ADN d'hémolymphe prélevés pour chacune des lignées et transferts expérimentaux, réalisée sur un gradient de température, montre une bande très intense correspondant à *Wolbachia* (flèche rouge).

plication par des amorces eubactériennes du gène 16S ARNr dans les échantillons d'hémolymphe provenant des différents passages de l'évolution expérimentale, l'électrophorèse réalisée sur gradient de température a permis de visualiser quasi exclusivement une seule bande de forte intensité (Figure V-6). Le clonage puis séquençage de cette bande et la confrontation des séquences obtenues avec les bases de données (BlastN) confirment qu'il s'agit bien de *Wolbachia*. Cependant, deux autres bactéries ont pu être identifiées au sein de deux échantillons via le même protocole : *Pseudomonas*, bactérie connue pour être présente dans l'hémolymphe d'*A. vulgare* et qui n'est pas pathogène pour lui (Braquart-Varnier com. pers.) et *Paracoccus*. La faible diversité bactérienne présente au sein des échantillons ainsi que l'absence de fixation d'une ou plusieurs bactéries lors des transferts semble indiquer que seule *Wolbachia* a été sélectionnée lors de l'évolution expérimentale et est ainsi responsable de la mortalité rencontrée chez les receveurs.

3.5 Y-a-t'il eu évolution de la virulence de *Wolbachia* au cours de l'évolution expérimentale ?

La dose inoculée aux animaux lors de chacun des transferts (correspondant aux densités mesurées au sein des hémocytes) augmente entre t_0 et t_5 . Cette augmentation de la densité bactérienne injectée est positivement corrélée à celle de la mortalité des individus. De ce fait, un lien peut être établi entre dose injectée et virulence, traduisant un effet dose-dépendant. Cependant, ce postulat n'est plus valide pour les transferts t_6 à t_8 puisque les doses injectées lors de ces passages sont similaires à celle inoculée aux individus du passage t_4 (Kruskal-Wallis ; $W = 3,5128$; $ddl = 3$; $p = 0,3191$) alors que les mortalités continuent d'augmenter au fur et à mesure des transferts. On a donc pour une même dose injectée, une virulence des *Wolbachia* différente traduisant l'évolution de la virulence du symbiote au cours de ces passages expérimentaux.

4 Discussion

La virulence d'un symbiote est dépendante de nombreux facteurs et l'un des plus importants n'est autre que son mode de transmission d'un hôte à l'autre. Ainsi, les symbiotes hérités de la mère devraient présenter un coût pour l'hôte globalement plus faible contrairement à la majeure partie des symbiotes horizontalement transmis (Kakehashi 1996 ; Lipsitch *et al.* 1996 ; Merçot & Poinso 2009). Lorsque l'on s'affranchit du compromis transmission verticale / virulence, de profondes modifications des niveaux de virulence du symbiote peuvent survenir (Bull *et al.* 1991 ; Magalon *et al.* 2010). Au cours de l'évolution expérimentale de la souche *wVulC* au sein de son hôte natif *A. vulgare*, nous avons pu mettre nettement en évidence une augmentation drastique des taux de *Wolbachia* (de l'ordre d'un facteur 2500) au sein des hémocytes des animaux inoculés provenant des trois lignées indépendantes, au fur et à mesure des passages horizontaux. Par ailleurs, si les densités de

Wolbachia augmentent également dans le système nerveux central des individus (de l'ordre de 45 fois), cette augmentation est bien plus faible que celle observée dans les hémocytes. Néanmoins, cette colonisation du système nerveux peut être liée à celle des hémocytes puisque des observations réalisées en microscopie électronique ont montré un trafic hémocytaire aux sein même des cellules nerveuses. Dans les ovaires, tissu siège de la transmission verticale, les quantifications mettent en évidence une importante fluctuation, il n'y pas ici un changement directionnel comme dans les hémocytes. Ces variations dans les taux de *Wolbachia* peuvent être liés aux cycles ovariens des hôtes plus qu'à la sélection. En effet, les *A. vulgare* femelles sont soumises à des cycles de ponte réguliers même lorsqu'elles sont non-fécondées.

En revanche, l'hémolymph s'avère être le tissu le plus colonisé par les *Wolbachia* au cours de cette expérience. C'est aussi celui dans lequel l'augmentation de densité des *Wolbachia* est la plus importante. L'observation des hémocytes en microscopie à épifluorescence suite à leur marquage en hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) révèle que dès le transfert t1, le pourcentage d'hémocytes colonisés par *Wolbachia* (~ 40 %) est similaire à celui observé chez les animaux naturellement infectés (Chevalier *et al.* 2011). Cette prévalence va augmenter très rapidement pour atteindre les 100 % dès le transfert t3. Par ailleurs, ces hémocytes montrent des charges en *Wolbachia* considérables : le nombre d'endosymbiotes présents au sein du cytoplasme des cellules étant sans commune mesure par rapport à celui observé dans les animaux naturellement infectés [Figure V-4, (Chevalier *et al.* 2011)]. L'augmentation des densités bactériennes dans les différents tissus, en particulier dans les hémocytes, entre le transfert t0 et le transfert t5, peut être mise en relation avec une augmentation de la mortalité des hôtes et ce pour les trois lignées. On peut voir un lien entre l'augmentation de la mortalité et celle de la dose de *Wolbachia* inoculée lors de chaque transfert, comme c'est le cas chez de nombreux pathogènes où dose et mortalité sont liées (Agnew & Koella 1997 ; Ebert & Lorenzi 1994). Par ailleurs, cette relation entre dose et virulence n'est pas sans rappeler les résultats obtenus pour la

même souche de *Wolbachia*, *wVulC*, inoculée au receveur *P. d. dilatatus*, chez lequel nous avons également noté une forte influence de la dose injectée sur la virulence. La réponse quant à la part de l'augmentation de la dose et celle du changement de virulence entraînant l'augmentation des mortalités est donnée juste après le transfert t5. Suite à ce nouveau transfert d'hémolymphe contenant les *Wolbachia* sélectionnées, la mortalité des hôtes s'est avérée être particulièrement forte : seuls quelques individus de chaque lignée expérimentale ont survécu et ont pu servir de donneurs pour le transfert suivant. D'un point de vue théorique, en n'utilisant que les quelques survivants on pourrait avoir sélectionné des bactéries moins virulentes qui n'ont pas tué leur hôte (Yourth & Schmid-Hempel 2006). Si les résultats de quantification de *Wolbachia* au sein des tissus mettent en effet en évidence une baisse suite au transfert t5 (ce qui signifie que lors des passages suivants une dose plus faible a été injectée), la mortalité des individus inoculés avec des doses pourtant similaires au passage t4 demeure très forte et continue même à augmenter. Dans le cas présent comme dans celui rencontré chez le virus phytopathogène BSMV (Stewart *et al.* 2005), la pathogénie causée par les souches sélectionnées ne semble donc pas majoritairement dépendante de la dose. Après le transfert t5, les hôtes inoculés au cours des passages suivants vont mourir plus rapidement qu'au cours des premiers transferts. Cette augmentation dans la pathogénie causée par ces souches sélectionnées serait donc liée à une augmentation de la virulence des souches au cours de l'évolution expérimentale. Ces modifications rapides et concomitantes (puisque similaires dans les trois lignées) peuvent être imputables à plusieurs processus notamment (i) à des mutations de certains gènes impliqués par exemple dans la synthèse de facteurs de virulence (avons-nous sélectionné des *Wolbachia* mutantes ?) ou (ii) à des modifications épigénétiques des souches (avons-nous sélectionné des symbiotes à forte plasticité phénotypique, en réponse aux modifications environnementales imposées par la sélection ?) (Bennett & Lenski 1997 ; Dillon *et al.* 2003 ; Little *et al.* 2006 ; Rainey 2004). Ces changements épigénétiques peuvent entraîner des variations du

niveau d'expression des facteurs de virulence via des modifications dans la méthylation de l'ADN, l'activation d'éléments transposables ou des variations au sein des états régulatoires nucléo-cytoplasmiques (opérons). Une approche par TGGE nous a permis de compléter notre étude en répondant à la question qui restait en suspens : la mortalité importante des hôtes est-elle uniquement due à des *Wolbachia* hypervirulentes ou bien l'évolution expérimentale a-t-elle aussi permis la sélection d'autres bactéries, potentiellement pathogènes ? L'analyse des différents échantillons par électrophorèse sur gel en gradient de température puis leur séquençage conduit par J. Dittmer a permis de montrer que *Wolbachia* était ultra-dominante chez les receveurs, que la diversité bactérienne co-existante dans l'hémolymphes à chaque transfert était très faible et surtout qu'aucune bactérie autre que *Wolbachia* ne persistait au fur et à mesure des transferts. Ainsi, aucune autre bactérie ne semble être impliquée dans la pathogénie induite par les transferts. Cela va une nouvelle fois dans le sens d'une augmentation de virulence de *Wolbachia* sous la pression du mode de transmission horizontal.

Sixième partie

Discussion générale

Si *Wolbachia* se transmet essentiellement par la voie verticale, l'existence de transferts horizontaux de cet endosymbiote n'est plus désormais à démontrer. Au cours de cette thèse, nous avons mis en lumière l'impact de ces transferts sur la physiologie des individus receveurs ainsi que certaines conséquences évolutives chez les nouveaux hôtes et leurs symbiotes. Transférer *Wolbachia* chez un nouvel hôte n'est pas sans conséquence sur la valeur sélective de ce dernier. En effet, nous avons montré que forcer l'interaction entre un hôte et un symbiote engendre au moins trois situations distinctes : (i) la souche de *Wolbachia* inoculée tue son nouvel hôte en raison de trop grandes modifications de son niveau de virulence [le filtre de compatibilité est fermé, (Combes 1995)], (ii) la souche s'implante et se maintient dans les tissus hôtes mais ne parvient pas à se transmettre à la génération suivante [le filtre de compatibilité est ouvert mais le filtre de transmission fermé, (Combes 1995)] (iii), en plus de coloniser les tissus hôtes et de s'y multiplier, la souche se transmet à la descendance [tous les filtres sont ouverts, (Combes 1995)]. Dans les deux premiers cas, du fait de la fermeture de certains filtres, les associations nouvellement créées sont caduques et *Wolbachia* ne peut pas se maintenir dans les populations. Le troisième cas, qui est celui le plus rarement rencontré, est le seul qui permette l'établissement d'une interaction durable de générations en générations d'hôtes.

Chez l'isopode terrestre *Porcellio dilatatus dilatatus*, ces trois situations sont rencontrées après inoculation indépendante de huit souches de *Wolbachia* infectant différentes espèces d'isopodes terrestres. Suite à ces injections, les interactions entre les trois souches qui induisent la féminisation de leur hôte natif (*wVulC*, *wVulM* et *wPruIII*) et *P. d. dilatatus* ont « glissé » vers une relation de type hôte / pathogène. En témoignent les nombreux symptômes affectant les individus injectés tels que la perte de la mobilité, le ralentissement de la prise de poids ainsi que l'apparition de convulsions, de tremblements des appendices locomoteurs et la remontée en surface des individus. L'ensemble de ces symptômes est rapidement suivi de la mort de tous

les animaux injectés. De telles modifications de virulence ne sont pas rencontrées avec les autres souches inoculées. Si la majeure partie d'entre elles s'implantent dans tous les tissus hôtes (ovaires, système nerveux central (SNC) et hémocytes), seules deux souches de *Wolbachia* induisant de l'incompatibilité cytoplasmique (IC) chez leurs hôtes natifs sont capables de se transmettre à la descendance. Parmi ces deux souches, l'une (*wDil*) provient d'une population de la même espèce, il s'agit donc un transfert intra-spécifique, tandis que l'autre (*wCon*) est issue d'une population de *Cylisticus convexus*, espèce phylogénétiquement distante de *P. d. dilatatus* (Mattern & Schlegel 2001 ; Michel-Salzat & Bouchon 2000), traduisant un transfert à l'échelle inter-spécifique. Trouver les causes du « glissement » vers l'interaction hôte / pathogène suite à l'injection des souches féminisantes chez *P. d. dilatatus* a été le premier enjeu de ce travail de thèse. Si les trois souches féminisantes se multiplient au sein du SNC de *P. d. dilatatus*, ce patron est également observé chez leurs hôtes natifs respectifs et après transfert intra-spécifique de la souche *wVulC* chez des *A. vulgare* asymbiotiques, sans pour autant atteindre les mêmes niveaux de virulence. Ce résultat démontre que la multiplication intense de *Wolbachia* dans les tissus ne constitue pas la cause majeure de la maladie rencontrée chez *P. d. dilatatus*. Chez ce dernier, la pathogénie suite à l'infection est en grande partie due à un important dérèglement des processus autophagiques, survenant dans les cellules nerveuses et adipeuses, induisant les différents symptômes précédemment décrits. Le manque de tolérance de *P. d. dilatatus* face à la multiplication de ces souches serait la cause majeure de cette intense réaction autophagique et donc de l'augmentation de la virulence (Schneider & Ayres 2008). Néanmoins, l'injection de la souche *wCon*, phylogénétiquement très proche de *wVulC* mais provoquant de l'IC chez son hôte natif (Cordaux *et al.* 2012) n'induit aucune mortalité chez *P. d. dilatatus*, bien qu'elle atteigne des densités similaires à celles mesurées avec la souche *wVulC* dans tous les tissus du receveur. À la vue de l'ensemble de ces résultats, on peut donc supposer un lien entre ces processus autophagiques exacerbés et des facteurs dits de

"virulence" sécrétés par *Wolbachia*, potentiellement liés à la féminisation.

Cependant, toutes les souches féminisantes inoculées chez *P. d. dilatatus* ne présentent pas les mêmes niveaux de virulence (la souche *wAs*, infectant les femelles comme les mâles, n'induit d'ailleurs aucune pathogénie) et nous avons pu démontrer une différence intrinsèque de virulence entre les souches *wVulC* et *wVulM*. A dose injectée équivalente, la souche *wVulC* s'avère plus pathogène que *wVulM* et cette dernière est présente à des densités plus faibles dans les tissus receveurs que la souche *wVulC*. Des différences de densités bactériennes pourraient donc être une des causes des variations de virulence entre ces deux souches vis-à-vis du receveur *P. d. dilatatus*. On constate également que le déroulement de la maladie est influencé par les doses initialement introduites dans l'hôte receveur. Ainsi, plus la dose injectée est massive, plus les symptômes sont forts et surviennent rapidement : ce genre de réponse « dose dépendante » est retrouvée pour de nombreux pathogènes (Jeffries 1982 ; Yates *et al.* 1983). On peut donc envisager un lien entre les doses initialement injectées, les densités bactériennes atteintes et la virulence. Néanmoins, les densités de *Wolbachia* mesurées dans les tissus des hôtes dès 15 jours post-injection (PI) et jusqu'à 75 jours PI (phase plateau) sont similaires quelle que soit la dose initiale injectée et entièrement liées au génotype bactérien, donc plus importantes pour la souche *wVulC* que pour *wVulM*. La multiplication des *Wolbachia* serait donc plus rapide lorsque les doses injectées sont plus faibles puisque le plateau est atteint au même moment, soit à 75 jours PI. L'existence même de ce plateau suggère celle d'un *quorum sensing*, système de régulation de la transcription de gènes déclenché à partir d'une certaine densité bactérienne même si l'on peut également envisager que la stabilisation des densités de *Wolbachia* soit due à la réaction de l'hôte. Le *quorum sensing* permet aux individus de la population bactérienne de coordonner un comportement face aux conditions environnementales lorsqu'une certaine densité de bactérienne est atteinte. Ce phénomène de communication bactérienne a été découvert pour la première fois chez les *Vibrio fischeri*, bactéries émettant une

luminescence uniquement lorsqu'une certaine concentration est atteinte au sein de l'organe bioluminescent de leurs hôtes, les seiches (Nealson *et al.* 1970 ; Ruby & McFall-Ngai 1999). Le *quorum sensing* est également démontré chez *Escherichia coli* où il est impliqué dans la régulation des gènes de la division cellulaire (Sitnikov *et al.* 1996) et fortement suspecté chez *Wolbachia* puisque ces endosymbiotes doivent répondre à des contraintes environnementales strictes, d'où la nécessité de réguler leurs densités à l'intérieur des cellules-hôtes qu'ils occupent (Mouton 2005). Les variations de virulence entre génotypes de *Wolbachia* pourraient donc être dues à (i) la densité atteinte par les symbiotes au moment de la phase plateau, plus faible pour la souche *wVulM* que pour la souche *wVulC*, (ii) ou bien à des facteurs (pouvant être qualifiés dans ce contexte de facteurs de virulence même si leur fonction primaire n'est sûrement pas de réduire la valeur sélective de leur hôte) qui diffèrent entre les souches. Par ailleurs, ces-dits facteurs de virulence peuvent être de nature différente et dépendants du « type » de féminisation induite chez les hôtes. En effet, les souches *wVulC*, *wVulM* et *wPruIII* présentent des niveaux de féminisation différents chez leurs hôtes natifs respectifs : (i) féminisation forte pour *wVulC* et *wVulM* puisque tous les individus infectés sont de phénotype femelle (avec *wVulC* qui biaise davantage le sex-ratio de la descendance hôte que *wVulM*), (ii) féminisation plus faible pour *wPruIII* puisque mâles et femelles sont infectés et (iii) le cas un peu à part de *wAs* qui reste à explorer. En effet, si cette souche induit des biais de sex-ratio en faveur des femelles chez *Oniscus asellus*, certains croisements sont également partiellement incompatibles suggérant également de l'IC (Moreau com. pers.). Par ailleurs, l'existence d'un facteur pouvant jouer un rôle à la fois dans la mort des mâles (donc virulence de *Wolbachia*) et la féminisation a été récemment suspecté chez le lépidoptère *Ostinia scapularis* (Sugimoto & Ishikawa 2012).

La comparaison des transcriptomes de ces souches féminisantes, selon le protocole établi par Darby *et al.* (2012) pour la souche de *Wolbachia wOo* infectant *Onchocercus volvulus* (nématode filaire), pourrait permettre l'identification des fac-

teurs impliqués dans la féminisation, qui dans le contexte de la transmission horizontale peuvent devenir, pour le receveur, des facteurs de virulence. Par ailleurs, l'interaction entre *Wolbachia* et son nouvel hôte pourrait aussi être abordée grâce à l'étude de l'expression des gènes de *P. d. dilatatus* transinfectés avec ces mêmes symbiotes et ainsi permettre d'analyser, au niveau des tissus nerveux et immunitaires, les perturbations d'ordre transcriptionnel chez les deux partenaires au cours de l'infection, notamment en fonction de la densité de *Wolbachia* dans les différents tissus. Un autre point crucial, pouvant permettre d'expliquer les résultats rencontrés suite aux transferts horizontaux expérimentaux de *Wolbachia* sera la comparaison entre les génomes des souches féminisantes et celles induisant de l'IC. Dans le cadre de la thèse menée par Myriam Badawi (encadrement R. Cordaux et P. Grève), cette comparaison de génome est effectuée entre les souches *wVulC* (féminisante) et *wCon* (IC). Ces deux souches sont particulièrement intéressantes à plusieurs points de vue : (i) bien qu'elles soient phylogénétiquement proches (Cordaux *et al.* 2012), elles n'induisent pas chez leurs hôtes respectifs le même phénotype étendu ; (ii) inoculées chez *P. d. dilatatus*, ces souches présentent des patrons de distribution similaires avec notamment une très forte multiplication dans le tissu nerveux. Cependant, si *wVulC* mène à une forte pathogénie entraînant la mort de tous les individus transinfectés, la souche *wCon* ne perturbe aucun des traits d'histoire de vie de son nouvel hôte et se transmet bien à la génération suivante où elle est également capable d'induire de l'IC (Marcadé & Sicard com. pers.). De ce fait, comparer les génomes des symbiotes permettra de caractériser des différences génomiques entre les deux souches et ainsi de mettre en évidence les facteurs de féminisation chez l'hôte natif *A. vulgare*, donc potentiellement ceux impliqués dans la virulence vis-à-vis de l'hôte receveur *P. d. dilatatus*.

Les souches féminisantes apparaissent comme moins aptes à coloniser de nouveaux hôtes par transfert horizontal, en raison d'une part, de la virulence qu'elles peuvent induire lors de leurs interactions avec l'hôte receveur mais également parce

que dans la plupart des cas la féminisation n'est pas effective lors des changements d'hôtes (Kageyama *et al.* 2008 ; Rigaud *et al.* 2001). Ainsi, féminiser son hôte pourrait nécessiter une plus étroite spécialisation entre les partenaires du fait des mécanismes potentiellement plus intimes requis pour cette manipulation physiologique. En revanche, les *Wolbachia* responsables d'IC chez leurs hôtes natifs maintiennent dans la grande majorité des cas, leur effet après passage dans l'hôte receveur, suggérant une plus grande conservation des mécanismes qui mènent à l'incompatibilité cytoplasmique. Ceci se vérifie lors de transferts horizontaux de souches induisant de l'IC chez les drosophiles, capables de conserver leur phénotype chez leur receveur cicadelle (Kang *et al.* 2003) ou moustique (Xi *et al.* 2006). Chez les isopodes terrestres, les souches responsables d'IC se transmettent et sont capables de maintenir leur phénotype étendu. Ce cas est rencontré avec la souche *wCon* inoculée chez *P. d. dilatatus* (Marcadé & Sicard, com. pers.) et chez *A. vulgare* (Moret *et al.* 2001). Le scénario évolutif proposé par Rigaud & Rousset (1996) suggère que l'IC serait le phénotype ancestral induit par *Wolbachia*. Par la suite, suivant différentes trajectoires évolutives, ce phénotype étendu aurait évolué, donnant naissance au trois autres phénotypes (parthénogenèse thélytoque, mort des mâles et féminisation). Ce scénario permettrait d'expliquer pourquoi les souches provoquant de l'IC, favorisant les multi-infections contrairement à la féminisation qui contribue au maintien d'une seule souche, sont les plus répandues mais aussi celles qui paraissent les plus aptes aux transferts horizontaux dans le monde des arthropodes. L'hypothèse d'IC comme phénotype ancestral est étayée par la découverte de Jaenike (2007b) concernant l'émergence d'un phénotype de mort des mâles chez *Drosophila subquinaria* ayant reçu un souche de *Wolbachia* induisant de l'IC suite aux croisements avec *Drosophila recens*. Ceci suggère que la mort des mâles peut évoluer à partir de l'IC et que ces deux effets auraient des bases moléculaires communes.

Ma thèse ne s'est pas uniquement focalisée sur l'hôte *P. d. dilatatus* en tant que receveur. En effet, des transferts horizontaux expérimentaux utilisant les mêmes

souches de *Wolbachia* ont été réalisés chez les isopodes terrestres *A. vulgare* et *Armadillo officinalis*. Avec les huit souches de *Wolbachia* injectées chez *A. vulgare* et les quatre inoculées à *A. officinalis*, nous montrons une nouvelle fois que toutes colonisent les tissus de leurs nouveaux hôtes. Chez ces deux receveurs, aucune *Wolbachia* n'engendre de perturbations nettes des traits d'histoire de vie en comparaison à celles observées chez le receveur *P. d. dilatatus*. Néanmoins, nous avons mis en évidence que les trois souches féminisantes, pathogènes pour le receveur *P. d. dilatatus* sont également celles qui diminuent nettement la durée de vie d'*A. vulgare*. Ce coût pour l'hôte n'est cependant détectable que pour la survie et non pour les autres traits d'histoire de vie du receveur *A. vulgare*. Nous pouvons supposer que les coûts induits sont liés au détournement des ressources des cellules par *Wolbachia* mais aussi potentiellement à la production de facteurs entraînant l'augmentation de sa virulence. Par ailleurs, on sait que *Wolbachia* peut contribuer à augmenter le stress oxydant (Brennan *et al.* 2008), ce dernier entraînant généralement une diminution de l'espérance de vie des individus, quelque soit l'espèce (Gems & Doonan 2009 ; Junqueira *et al.* 2004 ; Muller *et al.* 2007). La démonstration de la virulence des souches *wVulC* et *wVulM* chez leur hôte natif *A. vulgare* suite à un transfert horizontal est en accord avec les résultats de Braquart-Varnier *et al.* (2008) qui met en évidence une mortalité plus importante des animaux naturellement porteurs de ces souches comparés aux individus asymbiotiques. Cependant, la virulence apparaît plus importante dans le cadre d'un transfert horizontal que dans celui de la transmission verticale. Ceci suggère que l'invasion de l'animal à partir de bactéries introduites dans l'hémocoel est plus coûteuse que lorsque l'infection est initiée dès la cellule-oeuf. On peut aussi supposer que les animaux de la lignée symbiotique tolèrent mieux la présence de *Wolbachia*, du fait d'une plus longue co-évolution, que ceux non infectés par *Wolbachia*, vivant et se reproduisant sans cet endosymbiote depuis plusieurs dizaines de générations.

Les travaux présentés dans ce manuscrit démontrent donc la grande plasticité

des souches de *Wolbachia* d'isopodes terrestres qui sont capables de coloniser tous les tissus de leurs nouveaux hôtes. Les densités atteintes sont en revanche très variables et semblent plus liées à la souche bactérienne mise en jeu qu'à l'hôte. En effet, les densités atteintes chez l'hôte receveur sont assez proches de celles mesurées chez leurs hôtes natifs respectifs. Ainsi, le filtre de compatibilité (ou physiologique) permettant l'établissement de *Wolbachia* au sein des individus transinfectés est largement ouvert, suggérant que ces symbiotes trouvent les ressources nécessaires à leur multiplication et ne sont pas éliminées par le système immunitaire de l'hôte. En revanche, le filtre de transmission à la descendance est beaucoup plus stringent et semble très souvent fermé. Ainsi, dans le cas de *P. d. dilatatus*, seules deux souches de *Wolbachia* sur huit qui s'installent se transmettent clairement à la descendance.

Les lignées de *P. d. dilatatus* infectées, par les souches de *Wolbachia* *wDil* et *wCon*, ainsi obtenues ont été utilisées au cours du stage de Master 2 de Romain Pigeault (encadrement M. Sicard et C. Braquart-Varnier). Ces travaux ont démontré que le mode d'acquisition des souches de *Wolbachia* avait un effet sur la reproduction ainsi que sur certains paramètres immunitaires tels que l'activité de phénoloxydase (PO) et le taux d'hémocytes circulants (THC). Lorsque le nouveau symbiote est acquis par voie verticale, l'ensemble des paramètres est perturbé tandis que seul l'investissement reproducteur est modifié en cas d'inoculation du symbiote. Ces résultats suggèrent que la présence de *Wolbachia* dès l'embryogenèse peut entraîner une perturbation du développement du système immunitaire de l'hôte par une modification de l'allocation des ressources entre les différents traits de vie. Une nouvelle question se pose désormais : *Wolbachia* nouvellement associée à son hôte (par voie verticale) modifiera-t-elle la valeur sélective de ce dernier, comparé à une association plus ancienne ? Nous pouvons supposer que plus la symbiose est ancienne, plus la virulence du symbiote vis-à-vis de l'hôte s'en trouvera atténuée. De ce fait, la valeur sélective des animaux anciennement associés avec leur *Wolbachia* devrait être moins perturbée que celle d'hôtes vivant depuis peu avec leurs symbiotes.

Si la virulence de la souche *wVulC* peut être augmentée en cas de changement d'hôte (*P. d. dilatatus*), la levée du compromis transmission / virulence de cette souche chez son hôte natif *A. vulgare* modifie également de manière drastique sa virulence. De plus, si les changements de niveau de virulence d'un symbiote lors d'une modification du mode de transmission ont été largement prédits de manière théorique (Lipsitch *et al.* 1996), cela n'a été que peu testé au niveau expérimental (Bull *et al.* 1991 ; Magalon *et al.* 2010). Nous avons au cours de cette thèse mis en place un nouveau moyen de tester ces prédictions, en sélectionnant uniquement les *Wolbachia* présentes dans l'hémolymphe (voie de transmission horizontale), à chaque transfert horizontal dans un nouvel hôte, au détriment de la voie de transmission verticale habituelle. Si quelques coûts sur les traits d'histoire de vie d'*A. vulgare* avaient déjà été mis en évidence [(Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Sicard *et al.* 2010), Chapitre 3 du manuscrit], ces hôtes naturellement infectés peuvent vivre entre 2 et 3 ans avec leurs symbiotes et assurer leur reproduction (donc la transmission de *Wolbachia*). L'évolution expérimentale, en sélectionnant des *Wolbachia* provenant uniquement de l'hémolymphe, a entraîné une augmentation considérable de la densité de cet endosymbiote dans les hémocytes ainsi qu'une augmentation du pourcentage et du niveau de colonisation de ces cellules immunitaires. À cette hypercolonisation des hémocytes est associée une augmentation de la mortalité des hôtes infectés. Cependant, cette augmentation de mortalité semble plus liée à une augmentation de la virulence du symbiote qu'à celle de la dose injectée lors de chaque passage. À partir de ce constat, deux hypothèses non exclusives peuvent être proposées pour expliquer la rapide émergence d'une hypervirulence chez ces *Wolbachia* : (i) ce caractère hypervirulent peut être une caractéristique génétique des bactéries "évoluées" soit par sélection d'un sous-groupe de bactéries déjà présentes soit grâce à l'apparition de mutants ou (ii) le passage d'un mode de transmission vertical à une transmission exclusivement horizontale de la souche peut avoir modifié la régulation de certains gènes en réponse à la nouvelle contrainte environnementale avec l'inter-

vention potentielle de mécanismes épigénétiques (Dillon *et al.* 2003 ; Little *et al.* 2006 ; Rainey 2004). La rapidité troublante dans l'évolution de la virulence ainsi que la quasi-similarité des réponses obtenues dans les trois réplicats indépendamment sélectionnés, de même que la plasticité phénotypique des *Wolbachia* soulevée dans cette thèse, nous amène à penser que cette virulence exacerbée pourrait être davantage due à des modifications d'expression plutôt qu'à des différences génétiques entre les souches originelles et évoluées (Little *et al.* 2006). Les réponses à ces questions ne pourront être apportées que par la comparaison des génomes et des transcriptomes entre la souche *wVulC* originelle et les souches sélectionnées, nous permettant ainsi de mettre en évidence les gènes sur- et sous-exprimés chez ces dernières et potentiellement révéler les facteurs impliqués dans leur virulence. Mes travaux de thèse mettent également en lumière le plus fort effet pathogène des *Wolbachia* issues de l'hémolymphe comparées à celles provenant des ovaires lors d'un transfert horizontal chez *P. d. dilatatus*. Si le traitement mécanique (broyage et filtration) de l'inoculat effectué à partir des ovaires est une hypothèse permettant d'expliquer cette différence de virulence (goulot d'étranglement plus fort dans ce cas que lors d'une injection d'hémolymphe où davantage de bactéries seront viables pour infecter un nouvel hôte), elle n'est pas la seule. Nous pouvons également supposer qu'au sein d'un même hôte, résident plusieurs populations de *Wolbachia* qui ne possèdent pas les mêmes caractéristiques, notamment dans leur virulence intrinsèque. Ces populations (toutes issues de la population originelle transmise par le cytoplasme de l'ovocyte) pourraient ainsi se « spécialiser » et adapter leur niveau de virulence (ou tout du moins leur taux de multiplication) en fonction des tissus. Cette spécialisation aurait alors lieu à chaque génération d'hôte sous l'effet des contraintes sélectives présentes dans les tissus. Cependant, l'évolution expérimentale de *Wolbachia* via les transferts horizontaux d'hémolymphe a montré que sous une même pression de sélection, la virulence des bactéries pouvait grandement varier. Par conséquent, si une population de bactéries augmente en virulence dans un tissu, elles pourraient au final diminuer

la valeur sélective de l'ensemble des *Wolbachia* présentes dans l'organisme. Ainsi, des mécanismes fins de régulation de la virulence dans chaque tissu devraient être sélectionnés afin d'atteindre une virulence acceptable à chaque génération. Cette sélection pourrait avoir lieu indépendamment dans chaque tissu mais serait au final probablement perdue (à l'exception du tissu ovarien) car il est assez peu envisageable que des *Wolbachia* de chaque tissu retournent à l'ovaire et se répartissent uniformément dans chaque ovocyte pour être transmises à la génération suivante. Une autre hypothèse peut-être envisagée : tous les tissus constituant l'individu hôte sont autant d'environnements interdépendants pour la bactérie puisqu'une modification de la virulence dans un ou plusieurs tissus pourrait entraîner une baisse de la valeur sélective de l'hôte ou de la bactérie. Par conséquent, les différentes populations de *Wolbachia* spécifiques de chaque tissu devraient engendrer des pressions réciproques sur les autres tissus. Cependant, seul le tissu ovarien assure la quasi-totalité de la transmission des *Wolbachia*. Par conséquent, ces pressions réciproques devraient se traduire au fil des générations par la sélection au sein des ovaires des bactéries possédant des mécanismes qui permettront de réguler de façon optimale la virulence des différentes populations qui apparaîtront dans les tissus de l'hôte. Ces mécanismes de régulation pourraient être au final des mécanismes épigénétiques [modifications chimiques de l'ADN, de la demi-vie des transcrits, du taux de transcription ou des régulations post-transcriptionnelles etc. (Martin & Zhang 2007)] ou des mécanismes leur permettant de communiquer entre elles [tel que le *quorum sensing* (Mouton 2005)] en faisant intervenir des molécules de signalisation comme c'est le cas chez les bactéries entomopathogènes *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* (Dubois *et al.* 2012).

Mon travail de thèse s'est uniquement consacré à l'étude des transferts horizontaux menant à des mono-infections, c'est-à-dire lorsqu'une souche de *Wolbachia* arrive dans un hôte non infecté par d'autres souches de *Wolbachia*. Être à même de séparer les impacts de différentes souches de *Wolbachia* co-infectant un même

hôte s'avère difficile, toutefois, les cas de virulences extrêmes que nous avons caractérisés peuvent permettre de tester l'influence des interactions entre symbiotes au sein d'un même hôte. Ainsi, nous avons mis en évidence que la souche *wVulC* devient pathogène pour *P. d. dilatatus* asymbiotique. La question que l'on peut soulever ici est : Que se passe-t-il lorsque cette même souche est inoculée à un animal déjà porteur de *Wolbachia* (*P. d. dilatatus* porteur de la souche *wDil* ou *P. d. dilatatus* porteur de *wCon*) ? Suite à ce type de transferts, trois cas sont envisageables : (i) la virulence augmente, en lien avec la mutli-infection (Mouton *et al.* 2004) ; (ii) la virulence est similaire à celle rencontrée chez *P. d. dilatatus* non infecté : pas d'impact de la souche de *Wolbachia* déjà présente dans les tissus ; (iii) la virulence diminue : s'il existe un *quorum sensing* limitant la multiplication bactérienne ou si des *Wolbachia* génétiquement différentes sont capables d'inhiber la croissance les unes des autres comme cela a été montré chez d'autres bactéries notamment *Xenorhabdus nematophila* (Vigneux *et al.* 2008).

Si les transferts horizontaux de *Wolbachia* sont démontrés et étudiés via l'inoculation de nombreuses souches chez de nombreuses espèces d'arthropodes, peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes et les voies écologiques empruntées lors de ces transferts. Les relations hôtes-parasitoïdes (Heath *et al.* 1999 ; Vavre *et al.* 1999) ou des blessures permettant le contact entre hémolymphes de deux individus (Rigaud & Juchault 1995) peuvent conduire à un transfert horizontal de *Wolbachia* à l'échelle intra- comme à l'échelle inter-spécifique. En effet, les hémocytes infectés s'avèrent être d'excellents vecteurs de *Wolbachia* puisque nous avons mis en évidence que l'injection d'hémolymphe infectée permettait une colonisation plus rapide des tissus du receveur. Par ailleurs, nous avons démontré, au cours de cette thèse, que la voie trophique n'était clairement pas à négliger en matière de transferts horizontaux. Utilisant la capacité des isopodes terrestres à devenir prédateurs lorsqu'ils sont soumis à de fortes pressions environnementales (diète), nous avons pu détecter à la fois en PCRq et en hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

des *Wolbachia* provenant des individus consommés dans des cloportes « prédateurs » initialement asymbiotiques, ce qui n'avait jamais été prouvé jusqu'alors dans aucun modèle arthropode. Néanmoins, les densités de *Wolbachia* présentes dans les organes sont faibles, compromettant probablement la transmission verticale du symbiote. Augmenter le nombre de proies consommées par les prédateurs afin de voir s'il existe une corrélation positive avec les densités bactériennes dans les tissus de ces derniers, puis poursuivre les expérimentations plus loin dans la descendance des prédateurs afin d'évaluer la transmission verticale des souches acquises par interaction trophique, constitue l'étape suivante et nécessaire à la validation de cette nouvelle route. La possibilité de transmission via la prédation ouvre ainsi la voie à la mise en évidence de nouveaux chemins permettant aux *Wolbachia* de se répandre dans les populations hôtes.

Septième partie

Matériels et Méthodes

1 Matériel biologique

L'ensemble des travaux réalisés porte sur huit espèces d'isopodes terrestres, appartenant à la famille des crustacés Malacostracés. Afin de tester les impacts à court terme et à l'échelle évolutive, des transferts horizontaux de différentes souches de *Wolbachia* d'isopodes, trois espèces d'individus dites « receveuses » ont été sélectionnées, espèces phylogénétiquement assez éloignées les unes des autres.

Ainsi, la majeure partie de cette étude ayant trait aux transferts horizontaux de *Wolbachia* à l'échelle intra et interspécifique, porte sur l'isopode terrestre *Porcellio dilatatus dilatatus* (Brandt), appartenant à la famille des Porcellionidae (lignée Pdda du laboratoire, provenant de Rom (79), échantillonnée en 1988). *Armadillidium vulgare* (Latreille), appartenant à la famille des Armadillidiidae, constitue la seconde espèce injectée avec les différentes souches endosymbiotiques sélectionnées (lignée amphogène à sex-ratio équilibré WX, échantillonnée à Helsingor (Danemark) en 1991, ZM, échantillonnée d'Héraklion (Grèce) en 1989 et BF, récoltée dans l'arrière pays niçois en 1967). Ces deux espèces d'isopodes, très communes sur tout le territoire français, apprécient particulièrement les milieux anthropisés ainsi que les prairies calcaires, les zones agricoles et les lisières forestières (Vandel, 1962). Enfin, les injections ont été réalisées chez l'isopode *Armadillo officinalis* (Dumeril), de la famille des Armadillidae (population maintenue au laboratoire depuis 2001, individus provenant de Tunisie). Contrairement aux deux précédentes espèces utilisées, ces animaux, situés en position basale dans la phylogénie des isopodes terrestres, sont inféodés au pourtour méditerranéen et possèdent un cycle de vie plus long que celui de la majeure partie des isopodes terrestres. Tous les animaux « receveurs » injectés sont élevés au laboratoire, en lignées ou en populations et ne sont pas infectés par l'endosymbiote *Wolbachia*. Les α -protéobactéries *Wolbachia*, injectées chez les individus receveurs, sont non cultivables et sont donc obtenues après broyage d'organes d'individus infectés (cf. Protocole d'injection des animaux), élevés au laboratoire, en lignées contrôlées pour leur statut symbiotique. Huit souches de *Wolbachia*

d'isopodes sont utilisées dans l'objectif de déterminer les conséquences de tels transferts horizontaux sur les nouveaux hôtes ainsi que sur leur descendance. Les souches de *Wolbachia* utilisées pour cette étude sont :

- La souche *wVulC*, féminisante, provenant de la population thélygène (sex-ratio biaisé vers les femelles) WXw d'*A. vulgare*. Cette population est constituée d'individus provenant de la population WX auxquels des *Wolbachia* de la souche *wVulC* isolés des individus récoltés au Danemark ont été injectées. Cette souche est également présente dans la population thélygène ZN, provenant de Niort (79) et récoltée en 1961.
- La souche *wVulM*, féminisante, provenant de la population thélygène BI d'*A. vulgare*, provenant de Mery-sur-Cher (18), échantillonnée en 1999.
- La souche *wPruIII*, féminisante, provenant de la population PruIII de *Porcellionides pruinosus* (Brandt), provenant de Nevers (58), échantillonnée en 1996.
- La souche *wAs*, féminisante, provenant de la population OAw d'*Oniscus asellus* (Linné), provenant de Quinçay (86), échantillonnée en 1994.
- La souche *wDil*, induisant de l'incompatibilité cytoplasmique dans la population native de *P. d. dilatatus*, lignée PddB, échantillonnée sur l'île de Sainte Marguerite (06) en 2007.
- La souche *wPet*, responsable d'incompatibilité cytoplasmique chez *P. d. petiti*, sous-espèce de *P. dilatatus*, lignée Pet, échantillonnée sur l'île de Saint Honorat (06) en 1996.
- La souche *wCon*, provoquant de l'incompatibilité cytoplasmique chez son hôte natif *Cyclisticus convexus* (De Geer) de la lignée CCw, échantillonnée à Avanton (86) en 1993.
- La souche *wHel*, dont le phénotype étendu est jusqu'à présent inconnu, présente chez la population d'*Helleria brevicornis* Hb (Ebner) provenant de Bastia (2B) en 1992.

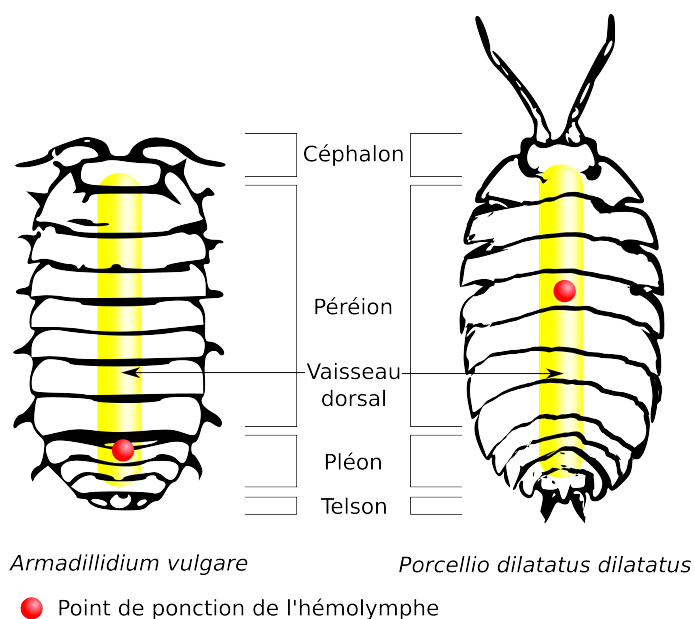


FIGURE VII-1 – Schéma de l'organisation générale et point de ponction de l'hémolymphe pour *A. vulgare* et *P. d. dilatatus*.

Ces populations sont élevées au laboratoire en condition de température contrôlée à 20°C et de photopériode naturelle dans des bacs de plastique (10 × 30 cm) contenant du terreau humide et de la nourriture ad libitum constituée de feuilles de tilleul séchées, riches en calcium et de carottes. Avant chaque expérimentation, la cuticule des animaux est désinfectée par une immersion dans de l'eau de javel à 3 % suivie par deux immersions successives dans de l'eau bidistillée. Chaque bain dure environ 30 secondes. Les animaux sont ensuite déposés sur un papier absorbant pour absorber l'excédent d'eau.

2 Prélèvement du matériel biologique

2.1 Prélèvement de l'hémolymphe

À l'aide d'une fine aiguille fixée sur un mandrin, un trou est percé soit dans la membrane articulaire entre le dernier segment du péréion et le premier segment du pléon, au niveau du vaisseau dorsal médian pour *A. vulgare*, soit au milieu du 4^{eme} segment du péréion pour les *P. d. dilatatus* (Figure VII-1). L'hémolymphe s'écoulant

par ce trou est prélevée rapidement à l'aide d'une micropipette et placée soit dans un microtube de 1,5 mL vide refroidi sur glace si l'hémolymphe recueillie est destinée à être injectée dans le but d'infecter un nouvel individu, soit dans un microtube de 1,5 mL contenant un tampon pour l'extraction d'ADN.

2.2 Prélèvement des gonades et de la chaîne nerveuse ventrale

La première étape consiste à libérer la cavité corporelle de l'animal. Pour cela, l'ablation du telson entraînant le tube digestif ainsi que celle de la tête entraînant les cæca digestifs est nécessaire. L'animal est ouvert en deux et la paire d'ovaires est prélevée puis déposée soit dans un microtube contenant du Ringer « isopode » (CaCl_2 1,4 mM ; NaHCO_3 2,4 mM ; KCl 2 mM ; NaCl 0,4 M ; osmolarité ajustée à 750 mOsm) afin de réaliser un inoculum bactérien soit dans un tampon pour l'extraction d'ADN. Chez les mâles, seuls les 6 utricules (trois utricules surmontant chacune les deux vésicules séminales de l'animal) sont prélevés pour en extraire l'ADN. La chaîne nerveuse est située en position ventrale. Elle est précautionneusement décollée du volet ventral de l'animal, en veillant à ce que les 7 ganglions (un par segment) soient présents et déposée dans un microtube contenant un tampon d'extraction pour l'ADN.

3 Protocole de préparation des inocula et injection des animaux

3.1 Préparation d'un inoculum bactérien

3.1.1 A partir de tissus infectés broyés

Les *Wolbachia* injectées chez les animaux « receveurs » sont obtenues à partir des tissus prélevés chez des isopodes femelles infectées. Pour obtenir 1 mL d'inoculum

bactérien, 5 femelles sont disséquées et les ovaires ainsi que la chaîne nerveuse ventrale sont déposés dans 500 μL de Ringer « isopode » filtré et broyés finement dans un Dounce de 2 mL. Le broyat est ensuite transféré dans un microtube de 1,5 mL et le Dounce est rincé avec 500 μL de Ringer filtré afin d'obtenir un volume final d'inoculum de 1 mL. L'extrait bactérien est ensuite filtré à travers une membrane percée de pores de 1,2 μm (Millipore) afin d'en éliminer les débris cellulaires mais de conserver les *Wolbachia*. L'inoculum est prêt à être injecté via une micro-seringue.

3.1.2 À partir d'hémolymphe

L'hémolymphe collectée (cf. 2. Prélèvement du matériel biologique) chez les animaux à l'aide d'une micropipette est poolée dans un microtube de 1,5 mL, déposée sur glace afin d'éviter tout phénomène de coagulation. L'hémolymphe doit ensuite être rapidement injectée pour éviter également toute coagulation dans la microseringue.

3.2 Injection de l'inoculum chez les isopodes terrestres

Les injections bactériennes chez les isopodes terrestres s'effectuent sous loupe binoculaire. À l'aide d'une fine aiguille fixée sur un mandrin, la cuticule calcique des animaux est percée sur le côté du 6^{eme} segment du péréion (afin de ne pas léser le vaisseau dorsal) de manière à former un trou de taille légèrement supérieure à la section du capillaire de verre effilé de la micro-seringue Hamilton. L'aiguille est ensuite introduite tangentiellement à la cuticule et 1 μL d'inoculum est injecté. Les animaux sont déposés dans des boîtes propres, sur un papier absorbant humide et gardés en observation pendant 24 heures. Ils seront par la suite remis en conditions d'élevage, une fois la blessure cicatrisée.

4 Mesures phénotypiques réalisées chez les animaux injectés

Quatre types de mesures phénotypiques sont réalisés chez les animaux injectés afin d'évaluer l'impact proximal du transfert horizontal des souches de *Wolbachia* chez de nouveaux hôtes. Les mesures sont réalisées pour chaque animal, aux mêmes pas de temps et dans l'ordre suivant :

4.1 Comportement d'enfouissement

Ce trait de comportement n'est observable que chez *P. d. dilatatus*. Ces animaux, particulièrement lorsqu'ils sont jeunes (âgés de moins d'un an) et non infectés par *Wolbachia*, vivent quasi exclusivement enfoui dans le substrat de leur boîte d'élevage. Chez les lignées symbiotiques, les individus en surface sont plus fréquents. Suite aux différentes injections de *Wolbachia*, les animaux sont suivis régulièrement (tous les 15 jours puis tous les 30 jours) et à chaque pas de temps, sont dénombrés les individus localisés en surface. Cet effectif, comparé à celui des animaux enterrés permet de montrer un éventuel impact de certaines souches de *Wolbachia* injectées.

4.2 Survie

Une fois dénombrés tous les individus présent en surface, les boîtes d'élevage sont vidées puis l'ensemble des animaux vivant est prélevé, déposé dans un cristalliseur sur un papier absorbant humide puis compté dans le but de déterminer leur survie suite aux injections de *Wolbachia*.

4.3 Activité locomotrice

Chaque individu dénombré est ensuite déposé dans une boîte de Pétri en verre. Durant 180 secondes, le temps que passe chaque animal à se mouvoir est décompté. Dans ce protocole comportemental, seul les mouvements qui permettent à l'animal

de se déplacer sont comptabilisés en terme de temps d'activité locomotrice. Les mouvements antennaires et de pattes n'étant pas liés aux déplacements ne sont pas pris en compte.

4.4 Prise de poids

Les individus sont finalement pesés sur une balance de précision ($d=0,001$ g). Leur poids au temps t est ensuite divisé par leur poids au temps $t=0$ (moment auquel ils ont été sélectionnés pour l'expérimentation), afin d'obtenir un ratio permettant de comparer tous les individus, ces derniers ayant le même âge mais pas nécessairement le même poids au départ.

5 Extraction d'ADN des différents tissus prélevés

Le protocole d'extraction d'ADN total est adapté de Kocher *et al.* (1989). Les tissus échantillonnés (gonades et chaîne nerveuse) sont broyés à l'aide d'un pilon dans 400 μL de tampon modifié d'après Wilson (Tris 100 mM ; EDTA 100 mM ; NaCl 100 mM ; SDS 0,1 % (m/v) ; DTT 50 mM ; pH 8) et 5 μL de protéinase K (5 U. μL^{-1}). Pour l'hémolymph et les inocula bactérien, 200 μL sont broyés (hémolymph) ou mélangés (inocula) dans 200 μL de tampon d'extraction et 5 μL de protéinase K. Le broyat est incubé pendant 4h au bain-marie à 37°C. Ensuite 200 μL de phénol et 200 μL de chloroforme/alcool isoamyle (24/1) sont ajoutés. Les échantillons sont mélangés par retournement puis centrifugés ($11\,000 \times g$, 8 minutes, 15°C). La phase aqueuse est prélevée et déposée dans un nouveau tube. La même opération est répétée sur la phase aqueuse. Ensuite, 400 μL de chloroforme/alcool isoamyle (24/1) sont ajoutés. Les échantillons sont à nouveau mélangés par retournement puis centrifugés ($11\,000 \times g$, 8 minutes, 15°C). La phase aqueuse est récupérée puis de l'acétate de sodium (3 M, pH 7, 1/10 v/v) et 400 μL d'isopropanol froid sont ajoutés. Les échantillons sont incubés à -20°C sur la nuit. Ils sont ensuite cen-

trifugés ($13\,000 \times g$, 30 minutes, 4°C). Les culots d'ADN sont lavés deux fois avec $500\,\mu\text{L}$ d'éthanol 70 % froid, séchés puis resuspendus dans $50\,\mu\text{L}$ d'eau stérile pour les tissus tels que les gonades, chaîne nerveuse et les inocula bactériens. Pour l'hémolymphe (extraction d'ADN des hémocytes), les culots d'ADN sont resuspendus dans seulement $25\,\mu\text{L}$ d'eau stérile.

6 Quantification de *Wolbachia* dans les tissus par PCR quantitative

La quantification du nombre de *Wolbachia* dans les différents tissus hôtes a nécessité le dessin d'une paire d'amorces consensus, permettant d'amplifier une séquence de 205 paires de bases du gène *wsp* (codant pour une protéine de surface, *Wolbachia* surface protein), très peu divergente entre les huit souches de *Wolbachia* d'isopodes utilisées dans ces travaux. Les amorces ont été dessinées à partir d'un alignement des séquences du gène *wsp* pour de nombreuses souches de *Wolbachia* appartenant au groupe A et B et du logiciel Primer 3 [version 2.2.1, octobre 2009 ; (Rozen & Skaletsky 2000)]. La T_m des amorces est fixée à 60°C . Les quantifications absolues par PCRq, effectuées à partir des échantillons d'ADN des tissus, sont réalisées à l'aide du LightCycler LC480 (Roche) selon les cycles suivants : 10 minutes à 95°C , [10 secondes à 95°C , 10 secondes à 60°C , 20 secondes à 72°C] $\times 45$. Une courbe de fusion [5 secondes à 95°C , 1 minute de 65°C à 97°C ($2^{\circ}\text{C}.\text{s}^{-1}$)] est réalisée à la fin de l'ensemble des cycles pour vérifier qu'un seul produit PCR a été généré. Le milieu réactionnel est constitué de $0,5\,\mu\text{L}$ des amorces *wsp208f* (5'-TGG-TGC-AGC-ATT-TAC-TCC-AG-3') et *wsp413r* (5'-TCG-CTT-GAT-AAG-CAA-AAC-CA-3') ($10\,\mu\text{M}$), de $5\,\mu\text{L}$ de Fast SYBR-Green Master Mix (Roche), de $3\,\mu\text{L}$ d'eau stérile et de $1\,\mu\text{L}$ d'ADN préalablement dosé (concentrations ajustées si nécessaire à $50\,\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$). Le nombre de copies du gène *wsp* présent dans $1\,\mu\text{L}$ de chaque échantillon d'ADN est calculé par rapport à une courbe étalon basée sur 7 dilutions sérielles d'un produit PCR

purifié du gène *wsp* (copies de *wsp*. μL^{-1} : 2.63×10^0 , 2.63×10^1 , 2.63×10^2 , 2.63×10^3 , 2.63×10^4 , 2.63×10^5 , 2.63×10^6 , 2.63×10^7). L'efficacité de la PCRq est également calculée via cette courbe standard. La concentration d'ADN total (hôte + *Wolbachia*) est utilisée afin de normaliser le nombre de copies de *wsp* pour chaque échantillon et pour chaque tissu. Pour chaque condition (individus $\times$ organe $\times$ souches de *Wolbachia*), deux réplicats techniques de quantification sont effectués.

7 Amplification du gène 16 S ARNr par PCR pour la migration TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) (en collaboration avec J. Dittmer)

Dans le but de caractériser les communautés bactériennes présentes dans les échantillons ADN extraits de l'hémolymphe utilisés pour l'évolution expérimentale, un premier fragment de 795 pb du gène bactérien 16S ARNr est amplifié à l'aide des amorces 27F (5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-A-3') et 786R (5'-CTA-CCA-GGG-TAT-CTA-AT-3'). La réaction PCR s'effectue dans un volume de 25 μL contenant un tampon PCR HotStart HiFidelity 1X (Qiagen), 2,5 U de HotStart HiFidelity DNA Polymerase (Qiagen), 1X Q Solution (Qiagen), la paire d'amorces à 1 μM et 1 μL d'échantillon ADN d'hémolymphe. L'amplification est effectuée dans un thermocycleur iCycler (Bio-Rad) selon les cycles suivants : 15 minutes à 95°C, [1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C, 1 minute à 72°C] $\times$ 35 puis 10 minutes à 72°C. Le produit d'amplification de cette première PCR est utilisé comme matrice pour une seconde amplification PCR ciblant la région variable V3 du gène 16S ARNr, à l'aide des amorces 338F (5'-ACT-CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AG-3') et 520R (5'-ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GG-3'). L'amorce 338F contient un GC-clamp de 42 nucléotides afin d'empêcher la dénaturation complète des brins d'ADN lors de la migration TGGE (Muyzer *et al.* 1993). Cette seconde réaction d'ampli-

fication est réalisée dans un volume de 25 μ L contenant 1 μ L d'amplifiats issus de la première réaction de PCR, 0,5 μ M de chaque amorce, 250 μ M de dNTP (dideoxyribonucléotides), 1X de tampon de réaction GoTaq (Promega) et 0,5 U d'enzyme polymérase GoTaq DNA polymerase. L'amplification s'effectue selon les cycles suivants : 3 minutes à 95°C, [30 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C, 30 secondes à 72°C] $\times$ 30 puis 10 minutes à 72°C. Chacune des amplifications PCR est contrôlée et confirmée par une électrophorèse des amplifiats réalisée sur gel d'agarose 1,5 %.

8 Détermination des communautés bactériennes par TGGE

Les migrations TGGE sont réalisées à l'aide du DCode Universal Mutation Detection SystemTM (Bio-Rad). Vingt microlitres d'amplifiat PCR de la région V3 du gène 16S ARNr sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 10 % [urée 8M, 20 % de formamide, 10 % de persulfate d'ammonium, 40 μ L de tetramethylethylenediamine (TEMED) dans un tampon TAE 50X (Tris 40 mM, acide acétique 20 mM, EDTA 1 mM)]. La migration des produits PCR s'effectue sur un gradient allant de 38°C à 70°C (gradient constant de 2°C/heure) à 95V dans du tampon de migration TAE 1,25X. Les fragments amplifiés de la région V3 du gène 16S ARNr obtenus pour différentes bactéries de référence (*Listeria ivanovii*, *Bacillus megaterium*, *Wolbachia spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Micrococcus luteus*) sont utilisés comme standard pour la migration. Après l'électrophorèse, le gel est incubé dans un bain de bromure d'éthidium puis photographié sous rayonnement ultra-violet (200 à 380 nm de longueur d'onde). Les patrons de bandes de TGGE sont normalisés à l'aide du logiciel GelAnalyzer 2010 (www.gelanalyzer.com).

9 Identification des bandes obtenues en TGGE par clonage puis séquençage

Afin de déterminer à quelle(s) souche(s) bactérienne(s) appartiennent les bandes obtenues, ces dernières sont excisées du gel TGGE, transférées dans des microtubes puis rincées avant d'être stockées dans 70 μ L d'eau stérile. Les microtubes contenant les bandes choisies pour le clonage puis le séquençage des amplifiats (2 réplicats par échantillon) sont incubés à 60°C pendant 1 heure puis à 4°C pendant 4 heures. Par la suite, 5 μ L de chaque éluat est utilisé pour une amplification PCR utilisant les mêmes conditions que la PCR d'amplification initiale du fragment V3 du gène 16S ARNr, à la différence près que l'amorce 338F ne contient plus de GC-clamp. Les produits PCR obtenus sont purifiés par précipitation avec de l'éthanol 100 % [2,5 :1 (vol/vol)] et de l'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) [1/10 :1 (vol/vol)], conservés une nuit -20°C et clonés dans des *Escherichia coli* JM109 compétentes en utilisant le kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega). Dix clones par bande (produits PCR purifiés) sont amplifiés à l'aide des amorces M13F and M13R (Promega) et du kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Le séquençage est effectué à l'aide du séquenceur ABI 310 (Applied Biosystems) puis les séquences obtenues sont identifiées par comparaison avec les bases de données à l'aide du programme BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

10 Microscopie électronique à transmission

Les ovaires, chaînes nerveuse et muscles prélevés chez les animaux disséqués sont plongés dans une solution de fixation refroidie sur de la glace (9 % glutaraldehyde ; 0,3 M sodium cacodylate ; 3 % NaCl ; v/v/v ; pH 7,3 à 7,4 ; osmolarité ajustée à 750 mOsm) pendant 2 heures à 4°C. Les tissus sont ensuite placés dans une solution de lavage (0,3 M sodium cacodylate ; 3 % NaCl ; 0,8 M sucrose ; v/v/v ; osmolarité 750

mOsm) pendant 2 heures à 4°C. Après élimination de la solution de lavage, les tissus sont incubés dans le post-fixateur contenant du tétroxyde d'osmium (cacodylate de sodium 0,3 M; NaCl 5,5 %; OsO₄ 4 %; v/v/v) pendant 45 minutes à température ambiante. La déshydratation des tissus est réalisée dans des solutions d'acétone de concentrations croissantes (de 35 % à 100 %). L'imprégnation de résine est effectuée en 2 étapes :

- Acétone 100 %-résine (Spurr, Polyscience Inc.) (v/v) pendant 12 heures à température ambiante.
- Résine pure dans les mêmes conditions.

L'inclusion est effectuée dans des « moules à plat » qui permettent une orientation des pièces; la polymérisation de la résine s'effectue pendant 24 heures dans une étuve à 70°C. Des coupes semi-fines et ultra-fines sont ensuite réalisées par Maryline Raimond à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert OMU3) muni d'un couteau soit de verre soit de diamant. Les coupes semifines de 500 nm d'épaisseur sont colorées au bleu de Toluidine à 1 % (pH 8,8) et observées au microscope photonique afin d'évaluer la qualité de l'échantillon. Les coupes ultrafines, récoltées sur des grilles en cuivre (300 mesh) sont contrastées selon la méthode de Reynolds *et al.* (1963) en 2 temps :

- Acétate d'uranyle 1 % dans de l'alcool 50 % (à l'obscurité), 1 minute.
- Citrate de plomb, 10 minutes.

Les observations sont réalisées sur le microscope électronique à transmission JEOL 100C du service d'imagerie Image UP de l'Université de Poitiers.

11 Détection des processus autophagiques par marquage anticorps LC3B

La protéine LC3B joue un rôle fondamental dans les processus autophagiques. Normalement, cette protéine se trouve libre dans le cytosol mais après le clivage

et la lipidation avec la phosphatidylethanolamine, la protéine LC3B se retrouve associée avec le phagophore, devenant de ce fait, un bon marqueur des vésicules autophagiques. La détection de cette protéine est effectuée à l'aide du kit LC3B Antibody Kit for Autophagy (Invitrogen). Dans ces travaux, le marquage a été réalisé sur la chaîne nerveuse ainsi que sur le tissu adipeux entourant cet organe. Pour des raisons de difficulté de pénétration des anticorps dans le tissu nerveux, seul le tissu adipeux a pu être correctement marqué. Ce tissu est déposé sur une lame d'histologie, dans 200 μL de solution de fixation [formaldéhyde 3,7 % - PBS (NaCl 137 mM ; Na_2HPO_4 12 H₂O 8 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; KCl 3 mM ; pH 7,3)] et incubé 15 minutes à température ambiante. Le fixateur est ensuite enlevé et les échantillons sont rincés trois fois successivement dans du PBS. La perméabilisation des cellules s'effectue après le dernier rinçage, par ajout de 200 μL de Triton [®] X-100 0,2 % dans du PBS. Après élimination de la solution de perméabilisation, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante avec 200 μL d'anticorps primaires (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un tampon de saturation BSA). La solution d'anticorps primaire est éliminée après incubation et les échantillons sont rincés trois fois successivement dans du PBS. Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à température ambiante en présence d'une solution de 200 μL d'anticorps secondaires (ciblant les anticorps primaires) couplés à un fluorochrome. Les échantillons sont montés dans une solution de Citifluor (AFI antifading, Citifluor, England) et observés au grossissement 63X d'un microscope à épifluorescence (Zeiss, Axio Observer - A1) couplé à un apotome et équipé du logiciel d'acquisition AxioVision 4.8.1 software (Zeiss).

12 Fixation et hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur hémocytes

12.1 Fixation des hémocytes sur lame traitée à la polylysine

Les hémocytes sont échantillonnés à partir de l'hémolymphes d'animaux infectés (cf. Prélèvement de l'hémolymphes). Deux microlitres d'hémolymphes sont déposés dans chacun des puits ($\sim \emptyset$ 7 mm) dessinés à l'aide d'un stylo à encre hydrophobe (Kindler GmbH & Co., Germany) sur une lame traitée à la polylysine (Kindler GmbH & Co., Germany), permettant un meilleur étalement et accroche des cellules. Afin d'éviter l'évaporation et permettre l'étalement de la goutte d'hémolymphes, le puits est couvert d'une lamelle de verre 18×18 mm (Chevalier *et al.* 2011). La lame est ensuite déposée dans une chambre humide et incubée 30 minutes à 4°C afin de permettre aux hémocytes de s'étaler correctement. Après l'étalement des cellules, la lame est immergée 5 minutes dans une solution fixatrice de paraformaldéhyde 1 % - PBS 1X (NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 12 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; KCl 3 mM; pH 7,3). Le tube falcon contenant la lame dans sa solution de PFA 1 % est agité dans le but de décoller les lamelles de verre et ainsi assurer une fixation adéquate des cellules sur la lame. Après 5 minutes de rinçage dans une solution de PBS 1X, les échantillons sont déshydratés dans trois bains successifs de 3 minutes d'éthanol à 50, 80 et 100 %. La lame est ensuite séchée à l'air libre avant l'étape d'hybridation.

12.2 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les hémocytes fixés

L'hybridation des sondes sur les échantillons d'hémocytes s'effectue suivant le protocole établi par Manz *et al.* (1996). Ce protocole a été adapté au modèle biologique du laboratoire, les isopodes terrestres. Dans chaque puits, est déposé 20 μL de solution d'hybridation constituée de tampon d'hybridation à 35 % (700 μL de

formamide 35 %; 360 μL de NaCl; 40 μL de Tris-HCl; *qsp* 2 mL H₂O; 2 μL de Triton [®] X-100), de 2 μL d'une solution équimolaire de sondes W1,2-Cy3 (30 ng.mL⁻¹), ciblant spécifiquement ARNr 16S de *Wolbachia* (Heddi *et al.* 1999) et de 0,2 μL de Phalloïdine – FITC (Sigma, Solution stock 100 mg.mL⁻¹; le méthanol contenu dans la solution de Phalloïdine doit être entièrement évaporé avant de réaliser l'hybridation car ce dernier inhibe la réaction) qui cible l'actine contenue dans les cellules, permettant le marquage du cytosquelette. La lame est ensuite incubée 1 heure 30 minutes à 46°C ($\pm$ 0,5°C) dans une chambre humidifiée avec le reste du tampon d'hybridation. Après incubation, la lame est plongée dans un tampon de rinçage à 35 % (1 mL de Tris; 700 μL de NaCl; 500 μL d'EDTA; *qsp* 50 mL H₂O bidistillée; 50 μL de Triton X-100) et incubée 15 minutes à 48°C. Après incubation dans le tampon de rinçage 35 %, la lame est rincée à l'eau bidistillée et séchée à l'air libre. Les échantillons d'hémocytes sont montés entre lame et lamelle dans un milieu mixte de DAPI (2,5 mg.mL⁻¹, Sigma), permettant de marquer le noyau des cellules via l'ADN nucléaire et de Citifluor (AF1 antifading, Citifluor, England). L'observation des échantillons est effectuée au grossissement X63 (objectif à immersion à huile) d'un microscope à épifluorescence (Axio Observer - A1, Zeiss) équipé du logiciel d'acquisition AxioVision 4.8.1 software (Zeiss). Le nombre d'hémocytes total ainsi que le nombre de cellules infectées par *Wolbachia* sont comptés sur 10 photos prises aléatoirement pour chacun des traitements, à l'aide du logiciel ImageJ [version 1.45, octobre 2011; (Rasband 1997)]. Les hémocytes situés en bordure des images et partiellement tronqués ne sont pas comptabilisés.

Bibliographie

-
- AERTSEN A. & MICHIELS C. W. (2004) : Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit Rev Microbiol*, 30(4):263–273.
- AGNEW P. & KOELLA J. C. (1997) : Virulence, parasite mode of transmission, and host fluctuating asymmetry. *Proc Biol Sci*, 264(1378):9–15.
- AKSOY S. (1995) : *Wigglesworthia gen. nov.* and *Wigglesworthia glossinidia sp. nov.*, taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int J Syst Bacteriol*, 45(4):848–851.
- ALIZON S. (2008) : Transmission-recovery trade-offs to study parasite evolution. *Am Nat*, 172(3):E113–E121.
- ANDRÉ J.-B., FERDY J.-B. & GODELLE B. (2003) : Within-host parasite dynamics, emerging trade-off and evolution of virulence with immune system. *Evolution*, 57(7):1489–1497.
- BALDO L., PRENDINI L., CORTHALS A. & WERREN J. H. (2007) : *Wolbachia* are present in southern african scorpions and cluster with supergroup F. *Curr Microbiol*, 55(5):367–373.
- BANDI C., ANDERSON T. J., GENCHI C. & BLAXTER M. L. (1998) : Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci*, 265(1413):2407–13.
- BARR K. L., HEARNE L. B., BRIESACHER S., CLARK T. L. & DAVIS G. E. (2010) : Microbial symbionts in insects influence down-regulation of defense genes in maize. *PLoS One*, 5(6):e11339.
- BAUMANN P. (2005) : Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu Rev Microbiol*, 59:155–189.
- BENNETT A. F. & LENSKI R. E. (1997) : Phenotypic and evolutionary adaptation of a model bacterial system to stressful thermal environments. *Exp Suppl*, 83:135–154.

-
- BIAN G., XU Y., LU P., XIE Y. & XI Z. (2010) : The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*, 6 (4):e1000833.
- BLAZEJAK A., KUEVER J., ERSÉUS C., AMANN R. & DUBILIER N. (2006) : Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (oligochaeta) from Bermuda and the Bahamas. *Appl Environ Microbiol*, 72(8):5527–5536.
- BONDS M. H. (2006) : Host life-history strategy explains pathogen-induced sterility. *Am Nat*, 168(3):281–93.
- BORDENSTEIN S. & ROSENGAUS R. B. (2005) : Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Curr Microbiol*, 51(6):393–398.
- BOUCHON D., RIGAUD T. & JUCHAULT P. (1998) : Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans : molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci*, 265(1401):1081–1090.
- BOUCHON D., CORDAUX R. & GRÈVE P. (2008), *Insect Symbiosis*, chapitre Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods, pages 273–294 : BOURTZIS K. & MILLER T., éditeurs. CRC press, Boca Raton, USA.
- BRAIG H. R., GUZMAN H., TESH R. B. & O'NEILL S. L. (1994) : Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367(6462):453–455.
- BRAQUART-VARNIER C., LACHAT M., HERBINIÈRE J., JOHNSON M., CAUBET Y., BOUCHON D. & SICARD M. (2008) : *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One*, 3(9):e3286.
- BREEUWER J. A. & JACOBS G. (1996) : *Wolbachia* : intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol*, 20(8):421–434.

-
- BREEUWER J. A., STOUTHAMER R., BARNS S. M., PELLETIER D. A., G. W., WEISBURG & WERREN J. H. (1992) : Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera : Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol Biol*, 1(1):25–36.
- BRENNAN L. J., KEDDIE B. A., BRAIG H. R. & HARRIS H. L. (2008) : The endosymbiont *Wolbachia pipientis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line. *PLoS One*, 3(5):e2083.
- BRIGHT M. & BULGHERESI S. (2010) : A complex journey : transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 8(3):218–30.
- BROWNLIE J. C., CASS B. N., RIEGLER M., WITSENBURG J. J., ITURBE-ORMAETXE I., MCGRAW E. A. & O'NEILL S. L. (2009) : Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog*, 5(4):e1000368.
- BROWNSTEIN J. S., HETT E. & O'NEILL S. L. (2003) : The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J Invertebr Pathol*, 84(1):24–29.
- BULL J., MOLINEUX I. & RICE W. (1991) : Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution*, 45:875–882.
- CALLAINI G., DALLAI R. & RIPARBELLI M. G. (1997) : *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *J Cell Sci*, 110:271–280.
- CASIRAGHI M., BORDENSTEIN S. R., BALDO L., LO N., BENINATI T., WERNEGREEN J. J., WERREN J. H. & 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(12):4015–4022.

CHENG T. C. (1991), *Parasite-host associations, coexistence or conflict ?*, chapitre Is parasitism symbiosis ? A definition of terms and the evolution of concepts, pages 15–36 : C.A. TOFT, AESCHLIMANN A. & BOLIS L., éditeurs. Oxford University Press, New York.

CHEVALIER F., HERBINIÈRE-GABOREAU J., BERTAUX J., RAIMOND M., MOREL F., BOUCHON D., GRÈVE P. & BRAQUART-VARNIER C. (2011) : The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* : Meeting with their invaders, *Wolbachia*. *PLoS One*, 6:e18531.

CLANCY D. J. & HOFFMANN A. A. (1997) : Behavior of *Wolbachia* endosymbionts from *Drosophila simulans* in *Drosophila serrata*, a novel host. *Am Nat*, 149(5): 975–988.

COMBES C. (1995), *Interactions durables, Ecologie et évolution du parasitisme* : Collection Ecologie N °26, Masson, Paris.

COOK P. E., McMENIMAN C. J. & O'NEILL S. L. (2008) : Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Adv Exp Med Biol*, 627:126–140.

CORDAUX R., MICHEL-SALZAT A. & BOUCHON D. (2001) : *Wolbachia* infection in crustaceans : novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol*, 14(2):237–243.

CORDAUX R., MICHEL SALZAT A., FRELON RAIMOND M., RIGAUD T. & BOUCHON D. (2004) : Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare* : evolutionary implications. *Heredity*, 93(1):78–84.

CORDAUX R., BOUCHON D. & GRÈVE P. (2011) : The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends Genet*, 27(8):332–41.

-
- CORDAUX R., PICHON S., HATIRA H. B. A., DOUBLET V., GRÈVE P., MARCADÉ I., BRAQUART-VARNIER C., SOUTY-GROSSET C., CHARFI-CHEIKHROUHA F. & BOUCHON D. (2012) : Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. *Zookeys*, (176):123–31.
- COVACIN C. & BARKER S. C. (2007) : Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta : Phthiraptera). *Parasitol Res*, 100(3):479–485.
- CZARNETZKI A. B. & TEBBE C. C. (2004) : Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in *Collembola*. *Environ Microbiol*, 6(1):35–44.
- DALE C. & MORAN N. A. (2006) : Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126(3):453–65.
- DARBY A. C., ARMSTRONG S. D., BAH G. S., KAUR G., HUGHES M. A., KAY S. M., KOLDKJÆR P., RADFORD A. D., BLAXTER M. L., TANYA V. N., TREES A. J., CORDAUX R., WASTLING J. M. & MAKEPEACE B. L. (2012) : Analysis of gene expression from the *Wolbachia* genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis. *Genome Res*.
- DAWKINS R. (1982), *The extended phenotype* : Oxford University Press, New York.
- DEBARRY H. A. (1879) : De la symbiose. *Revue internationale des Sciences*, 3:301–309.
- DEDEINE F., VAVRE F., FLEURY F., LOPPIN B., HOCHBERG M. E. & BOULETREAU M. (2001) : Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11):6247–6252.
- DEDEINE F., BOULÉTREAU M. & VAVRE F. (2005) : *Wolbachia* requirement for oogenesis : occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity*, 95:394–400.

-
- DETHLEFSEN L., MCFALL-NGAI M. & RELMAN D. A. (2007) : An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449 (7164):811–818.
- DILLON J., MILLER S. & . R. C. (2003) : UV-acclimation responses in natural populations of *cyanobacteria* (*Calothrix* sp.). *Environ Microbiol*, 5:473–483.
- DOBSON S. & TANOUYE M. (1996) : The paternal sex ratio chromosome induces chromosome loss independently of *Wolbachia* in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Dev. Genes Evol.*, 206:207–217.
- DOBSON S. L., RATTANADECHAKUL W. & MARSLAND E. J. (2004) : Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single-and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, 93(2):135–142.
- DOBSON S. L., FOX C. W. & JIGGINS F. M. (2002) : The effect of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems. *Proc Biol Sci*, 269(1490):437–445.
- DONG P., WANG J.-J., HU F. & JIA F.-X. (2007) : Influence of *Wolbachia* infection on the fitness of the stored-product pest *Liposcelis tricolor* (Psocoptera : Liposcelididae). *J Econ Entomol*, 100(4):1476–1481.
- DOUGLAS A. E. (2010), *The symbiotic habitat* : Princeton University Press, New Jersey, USA.
- DUBOIS T., FAEGRI K., PERCHAT S., LEMY C., BUISSON C., NIELSEN-LEROUX C., GOHAR M., JACQUES P., RAMARAO N., KOLSTØ A.-B. & LERECLUS D. (2012) : Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog*, 8(4):e1002629.
- DURON O., BOUCHON D., BOUTIN S., BELLAMY L., ZHOU L., ENGELSTÄDTER J. & HURST G. D. (2008) : The diversity of reproductive parasites among arthropods : *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol*, 6:27.

-
- EBERT D. & HERRE E. (1996) : The evolution of parasitic diseases. *Parasitol Today*, 12:96–101.
- EBERT D. & LORENZI R. (1994) : Evolutionary biology. Parasites and polymorphisms. *Nature*, 369(6483):705–706.
- EDNEY E., ALLEN W. & MCFARLANE J. (1974) : Predation by terrestrial isopods. *Ecology*, 55:428–433.
- ENGELSTÄDTER J. & HURST G. D. D. (2009) : The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Ann Rev Ecol Evol Syst*, 40(1):127–149.
- ENIGL M., ZCHORI-FEIN E. & SCHAUSSBERGER P. (2005) : Negative evidence of *Wolbachia* in the predaceous mite *Phytoseiulus persimilis*. *Exp Appl Acarol*, 36(4):249–262.
- EVANS O., CARAGATA E. P., MCMENIMAN C. J., WOOLFIT M., GREEN D. C., WILLIAMS C. R., FRANKLIN C. E., O'NEILL S. L. & MCGRAW E. A. (2009) : Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. *J Exp Biol*, 212(10):1436–1441.
- EWALD H. A. (1987) : Transmission mode and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann New York Acad Sci*, 503:344–346.
- EWALD P. (1993) : L'évolution de la virulence. *Pour la science*, 188:90–97.
- FARMER E. E. & DUBUGNON L. (2009) : Detritivorous crustaceans become herbivores on jasmonate-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:935–940.
- FELLOUS S. & SALVAUDON L. (2009) : How can your parasites become your allies ? *Trends Parasitol*, 25(2):62–66.
- FENN K. & BLAXTER M. (2004) : Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts ? *Trends Ecol Evol*, 19(4):163–166.

-
- FERDY J. & GODELLE B. (2005) : Diversification of transmission modes and the evolution of mutualism. *Am Nat*, 166:613–627.
- FIALHO R. F. & STEVENS L. (2000) : Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc Biol Sci*, 267(1451):1469–1473.
- FLEURY F., VAVRE F., RIS N., FOUILLET P. & BOULÉTREAU M. (2000) : Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology*, 121 Pt 5:493–500.
- FRY A. J., PALMER M. R. & RAND D. M. (2004) : Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93(4):379–389.
- FU Y., GAVOTTE L., MERCER D. R. & DOBSON S. L. (2010) : Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. *Appl Environ Microbiol*, 76(17):5887–5891.
- FYTROU A., SCHOFIELD P. G., KRAAIJEVELD A. R. & HUBBARD S. F. (2006) : *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc Biol Sci*, 273(1588):791–796.
- FÉLIX C., PICHON S., BRAQUART-VARNIER C., BRAIG H., CHEN L., GARRETT R. A., MARTIN G. & GRÈVE P. (2008) : Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for type IV secretion machinery in *Wolbachia* of *Armadillidium vulgare*. *Research in Microbiology*, 159(6):481–485.
- GAGE D. J. (2004) : Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2):280–300.
- GARLAND T. & KELLY S. A. (2006) : Phenotypic plasticity and experimental evolution. *J Exp Biol*, 209(12):2344–2361.

-
- GEMS D. & DOONAN R. (2009) : Antioxidant defense and aging in *C. elegans* : is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle*, 8(11):1681–1687.
- GIRIN C. (1997) : *Un exemple de symbiose chez les Trichogrammes (hym. parasitoïdes) : Wolbachia contrôlant la capacité d'infestation chez Trichogramma bourarachae*. Thèse de doctorat, Université Lyon I.
- GIRIN C. & BOULÉTREAU M. (1995)a : Maternal inheritance of infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* : the role of symbionts. *Norwegian J Agri Sci*, 16:177–184.
- GIRIN C. & BOULÉTREAU M. (1995)b : Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera :Trichogrammatidae). *Experientia*, 51:98–401.
- GLASER R. L. & 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(8):e11977.
- GOTOH T., SUGASAWA J., NODA H. & KITASHIMA Y. (2007) : *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in Japanese populations of *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, 42(1):1–16.
- GOTTLIEB Y., ZCHORI-FEIN E., WERREN J. H. & KARR T. L. (2002) : Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera : Pteromalidae). *J Invertebr Pathol*, 81(3):166–174.
- GRENIER S., PINTUREAU B., HEDDI A., LASSABLIÈRE F., COENRAAD J., LOUIS C. & KHATCHADOURIAN C. (1998) : Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proc Biol Sci*, 265(1404):1441–1445.
- HACKSTADT T. (1996) : The biology of *rickettsiae*. *Infect Agents Dis*, 5(3):127–143.

-
- HEATH B. D., BUTCHER D. J., WHITFIELD W. G. F. & HUBBARD S. F. (1999) : Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology*, 9:313–316.
- HEDDI A., GRENIER A. M., KHATCHADOURIAN C., CHARLES H. & NARDON P. (1999) : Four intracellular genomes direct weevil biology : nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and *Wolbachia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12):6814–6819.
- HEDGES L. M., BROWNLIE J. C., O'NEILL S. L. & JOHNSON K. N. (2008) : *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322(5902):702.
- HERTIG M. (1936) : The rickettsia *Wolbachia pipientis* and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28:453–486.
- HERTIG M. & WOLBACH S. (1924) : Studies on *rickettsia*-like microorganisms in insects. *J Med Res*, 44:329–374.
- HILGENBOECKER K., HAMMERSTEIN P., SCHLATTMANN P., TELSCHOW A. & WERREN J. H. (2008) : How many species are infected with *Wolbachia* ? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett*, 281(2):215–220.
- HIROSE E. & FUKUDA T. (2006) : Vertical transmission of photosymbionts in the colonial ascidian *Didemnum molle* : the larval tunic prevents symbionts from attaching to the anterior part of larvae. *Zoolog Sci*, 23(8):669–674.
- HOERAUF A., NISSEN-PÄHLE K., SCHMETZ C., HENKLE-DÜHRSEN K., BLAXTER M. L., BÜTTNER D. W., GALLIN M. Y., AL-QAOUD K. M., LUCIUS R. & FLEISCHER B. (1999) : Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest*, 103(1):11–18.

-
- HOFFMANN A. & TURELLI M. (1997), *Influential passengers*, chapitre Cytoplasmic incompatibility in insects., pages 42–80 : O'NEILL S., WERREN J. & HOFFMANN A., éditeurs. Oxford University Press, New York.
- HOSOKAWA T., KOGA R., KIKUCHI Y., MENG X.-Y. & FUKATSU T. (2010) : *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(2):769–774.
- HUGHES G. L., KOGA R., XUE P., FUKATSU T. & RASGON J. L. (2011) : *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 7(5):e1002043.
- HUIGENS M. E., LUCK R. F., KLAASSEN R. H., MAAS M. F., TIMMERMANS M. J. & STOUTHAMER R. (2000) : Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405(6783):178–9.
- HUIGENS M. E., de ALMEIDA R. P., BOONS P. A. H., LUCK R. F. & STOUTHAMER R. (2004) : Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc Biol Sci*, 271(1538):509–15.
- HURST G. D., JOHNSON A. P., SCHULENBURG J. H. & FUYAMA Y. (2000) : Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila* : a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, 156(2):699–709.
- HURST G. D. D., JIGGINS F. J., SCHULENBURG J., BERTRAND D. & WEST S. A. (1999) : Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond*, 266:735–740.
- HURST G., HURST L. & MAJERUS M. (1997), *Influential passengers*, chapitre Cytoplasmic sex-ratio distorters, pages 125–154 : O'NEILL S., WERREN J. & HOFFMANN A., éditeurs. Oxford University Press, New York.
- HURST T. P., PITTMAN G., O'NEILL S. L., RYAN P. A., NGUYEN H. L. & KAY B. H. (2012) : Impacts of *Wolbachia* infection on predator prey relationships : evaluating

-
- survival and horizontal transfer between *wMelPop* infected *Aedes aegypti* and its predators. *J Med Entomol*, 49(3):624–630.
- ITURBE-ORMAETXE I., WALKER T. & O'NEILL S. L. (2011) : *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep*, 12(6):508–518.
- JAENIKE J. (2007)a : Fighting back against male-killers. *Trends Ecol Evol*, 22(4):167–9.
- JAENIKE J. (2007)b : Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. *Evolution*, 61(9):2244–2252.
- JEFFRIES V. (1982) : Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29:201–226.
- JEYAPRAKASH A. & HOY M. A. (2000) : Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification : *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*, 9(4):393–405.
- JIGGINS F. M., HURST G. D. & MAJERUS M. E. (2000) : Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proc Biol Sci*, 267(1438):69–73.
- JIN C., REN X. & RASGON J. L. (2009) : The virulent *Wolbachia* strain *wMelPop* efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Appl Environ Microbiol*, 75(10):3373–3376.
- JUCHAULT P. & MOCQUARD J. (1988) : Effets de la température sur le sex ratio de la descendance et la physiologie sexuelle des femelles d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea) hébergeant une bactérie féminisante. *C R Acad Sci Paris*, 306:321–324.
- JUCHAULT P. & MOCQUARD J. (1993) : Transfer of a parasitic sex factor to the nuclear genome of the host : a hypothesis on the evolution of sex-determining

-
- mechanisms in the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *J Evol Biol*, 6:511–528.
- JUCHAULT P., LEGRAND J. J. & MARTIN G. (1974) : Action interspécifique du facteur épigénétique féminisant responsable de la théygénie et de l'intersexualité du Crustacé *Armadillidium vulgare* (Isopode Oniscoïde). *Annales d'Embryologie et de Morphogenèse*, 7(3):265–276.
- JUCHAULT P., MARTIN G. & LEGRAND J. (1980) : Induction par la température d'une physiologie mâle chez les néo-femelles et les intersexués du Crustacé Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr., hébergeant un bactéroïde à action féminisante. *Inter J Invertebrate Repro*, 2:223–235.
- JUCHAULT P., FRELON M., BOUCHON D. & RIGAUD T. (1994) : New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods. *CR Acad Sci Paris*, 317:225–230.
- JUNQUEIRA V. B. C., BARROS S. B. M., CHAN S. S., RODRIGUES L., GIAVAROTTI L., ABUD R. L. & DEUCHER G. P. (2004) : Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med*, 25(1-2):5–16.
- KAGEYAMA D., NARITA S. & NODA H. (2008) : Transfection of feminizing *Wolbachia* endosymbionts of the butterfly, *Eurema hecabe*, into the cell culture and various immature stages of the silkworm, *Bombyx mori*. *Microb Ecol*, 56(4):733–741.
- KAISER W., HUGUET E., CASAS J., COMMINS C. & GIRON D. (2010) : Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc Biol Sci*, 277(1692):2311–2319.
- KAKEHASHI M. (1996) : Population and infectious diseases : dynamics and evolution. *Res Popul Ecol*, 38:203–210.
- KAMBRIS Z., COOK P. E., PHUC H. K. & SINKINS S. P. (2009) : Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, 326(5949):134–136.

-
- KAMBRIS Z., BLAGBOROUGH A. M., PINTO S. B., BLAGROVE M. S. C., GODFRAY H. C. J., SINDEN R. E. & SINKINS S. P. (2010) : *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 6(10):e1001143.
- KANG L., MA X., CAI L., LIAO S., SUN L., ZHU H., CHEN X., SHEN D., ZHAO S. & LI C. (2003) : Superinfection of *Laodelphax striatellus* with *Wolbachia* from *Drosophila simulans*. *Heredity*, 90(1):71–76.
- KHAN K. (1981) : *Studies of pathogens of termites of Pakistan*. Thèse de doctorat, University of The Punjab.
- KOCHER T. D., THOMAS W. K., MEYER A., EDWARDS S. V., PÄÄBO S., VIL-LABLANCA F. X. & WILSON A. C. (1989) : Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(16):6196–200.
- KOSE H. & KARR T. L. (1995) : Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. *Mech Dev*, 51(2-3):275–288.
- KRAAIJEVELD K., FRANCO P., DE KNIJFF P., STOUTHAMER R. & VAN ALPHEN J. J. M. (2011) : Clonal genetic variation in a *Wolbachia*-infected asexual wasp : horizontal transmission or historical sex ? *Mol Ecol*, 20(17):3644–52.
- KREMER N., VORONIN D., CHARIF D., MAVINGUI P., MOLLEREAU B. & VAVRE F. (2009) : *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*, 5(10):e1000630.
- KREMER N., DEDEINE F., CHARIF D., FINET C., ALLEMAND R. & VAVRE F. (2010) : Do variable compensatory mechanisms explain the polymorphism of the dependence phenotype in the *Asobara tabida*-*Wolbachia* association ? *Evolution*, 64(10):2969–2979.

-
- KRUEGER D. M., GUSTAFSON R. G. & CAVANAUGH C. M. (1996) : Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia : Protobranchia). *Biol Bull*, 190(2):195–202.
- LACHAT M. (2009) : *Impact de deux souches de Wolbachia sur les traits d'histoire de vie de leurs hôtes Armadillidium vulgare*. Thèse de doctorat, Ingénierie Chimique Biologique et Géologique, Université de Poitiers.
- LAVEN H. (1967), *Genetics of insect vectors of disease*, chapitre Speciation and evolution in *Culex pipiens*, pages 251–275 : WRIGHT J. & PAL R., éditeurs. Elsevier, Amsterdam.
- LE CLEC'H W., BRAQUART-VARNIER C., RAIMOND M., FERDY J.-B., BOUCHON D. & SICARD M. (2012) : High virulence of *Wolbachia* after host switching : when autophagy hurts. *PLoS Pathog*, 8(8):e1002844.
- LEFEBVRE F. (2002) : *Stratégies de reproduction chez les crustacés isopodes terrestres*. Thèse de doctorat, Université de Poitiers.
- LEGRAND J. J., MARTIN G. & ARTAULT J. C. (1978) : Corrélation entre la présence d'un symbionte bactérien dans les ovocytes de *Porcellio dilatatus petiti*, et la stérilité du croisement *P.d. petiti* mâle x *P. d. dilatatus* femelle. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 55(4):507–514.
- LEGRAND J. & JUHAULT P. (1986) : Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la spéciation chez les crustacés oniscoïdes. *Bolletino di Zoologia*, 53:161–171.
- LEIGH E. G. (2010) : The evolution of mutualism. *J Evol Biol*, 23(12):2507–2528.
- LEVINE B. & DERETIC V. (2007) : Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 7(10):767–77.

-
- LEVINE B. & KLIONSKY D. J. (2004) : Development by self-digestion : molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4):463–77.
- LEVINE B. & KROEMER G. (2008) : Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1):27–42.
- LIM-FONG G. E., REGALI L. A. & HAYGOOD M. G. (2008) : Evolutionary relationships of *Candidatus Endobugula* bacterial symbionts and their *Bugula* bryozoan hosts. *Appl Environ Microbiol*, 72:3605–3609.
- LINDSTROM M. J. & BATES D. M. (1988) : Newton-Raphson and EM Algorithms for Linear Mixed-Effects Models for Repeated-Measures Data. *J Am Stat Assoc*, 83:1014–1022.
- LIPSITCH M. & MOXON E. R. (1997) : Virulence and transmissibility of pathogens : what is the relationship ? *Trends Microbiol*, 5(1):31–7.
- LIPSITCH M., SILLER S. & NOWAK M. A. (1996) : The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution*, 50(5):1729–1741.
- LITTLE T. J., WATT K. & EBERT D. (2006) : Parasite-host specificity : experimental studies on the basis of parasite adaptation. *Evolution*, 60(1):31–38.
- LO N., PARASKEVOPOULOS C., BOURTZIS K., O'NEILL S. L., WERREN J. H., BORDENSTEIN S. R. & BANDI C. (2007) : Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 3):654–657.
- LO N., CASIRAGHI M., SALATI E., BAZZOCCHI C. & BANDI C. (2002) : How many *Wolbachia* supergroups exist ? *Mol Biol Evol*, 19(3):341–346.
- MACKINNON M. J. & READ A. F. (1999) : Selection for high and low virulence in the malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Proc Biol Sci*, 266(1420):741–748.

-
- MAGALON H., NIDELET T., MARTIN G. & KALTZ O. (2010) : Host growth conditions influence experimental evolution of life history and virulence of a parasite with vertical and horizontal transmission. *Evolution*, 64(7):2126–2138.
- MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., VANCANNEYT M. & SCHLEIFER K. H. (1996) : Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142 (Pt 5):1097–1106.
- MARGULIS L. (1993), *Symbiosis in cell evolution* : W.H. Freeman and Company, New York.
- MARTIN C. & ZHANG Y. (2007) : Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol*, 19(3):266–272.
- MARTIN G., JUCHAULT P. & LEGRAND J. (1973) : Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. *C R Acad Sci Paris*, 276:2313–2316.
- MATSUURA Y., KIKUCHI Y., MENG X. Y., KOGA R. & FUKATSU T. (2012) : Novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts associated with stinkbugs and other arthropods. *Appl Environ Microbiol*, 78(12):4149–56.
- MATTERN D. & SCHLEGEL M. (2001) : Molecular evolution of the small subunit ribosomal DNA in woodlice (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) and implications for Oniscidean phylogeny. *Mol Phylogenet Evol*, 18(1):54–65.
- MAYNARD-SMITH J. (1989) : Generating novelty by symbiosis. *Nature*, 341:284–285.
- McFALL-NGAI M., HEATH-HECKMAN E. A. C., GILLETTE A. A., PEYER S. M. & HARVIE E. A. (2012) : The secret languages of coevolved symbioses : insights from the *Euprymna scolopes* - *Vibrio fischeri* symbiosis. *Semin Immunol*, 24(1):3–8.

-
- MCGRAW E. A., MERRITT D. J., DROLLER J. N. & O'NEILL S. L. (2002) : *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2918–23.
- McMENIMAN C. J. & 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(7):e748.
- McMENIMAN C. J., LANE A. M., FONG A. W. C., VORONIN D. A., ITURBE-ORMAETXE I., YAMADA R., MCGRAW E. A. & O'NEILL S. L. (2008) : Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. *Appl Environ Microbiol*, 74(22):6963–9.
- McMENIMAN C. J., LANE R. V., CASS B. N., FONG A. W. C., SIDHU M., WANG Y.-F. & O'NEILL S. L. (2009) : Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910):141–4.
- MERÇOT H. & POINSOT D. (2009) : Infection by *Wolbachia* : from passengers to residents. *C R Biol*, 332(2-3):284–297.
- MESSENGER S. L., MOLINEUX I. J. & BULL J. J. (1999) : Virulence evolution in a virus obeys a trade-off. *Proc Biol Sci*, 266(1417):397–404.
- MICHEL-SALZAT A. & BOUCHON D. (2000) : Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *C R Acad Sci III*, 323(9):827–37.
- MICHEL-SALZAT A., CORDAUX R. & BOUCHON D. (2001) : *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (Crustacea : Oniscidea) : evidence for host-dependent patterns of infection. *Heredity*, 87(4):428–34.
- MIN K. T. & 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(20):10792–6.

-
- MORAN N. A. & DEGNAN P. H. (2006) : Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Mol Ecol*, 15(5):1251–1261.
- MORAN N. A., MCCUTCHEON J. P. & NAKABACHI A. (2008) : Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet*, 42:165–190.
- 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., HUGO L. E., JOHNSON K. N., KAY B. H., MCGRAW E. A., van den HURK A. F., RYAN P. A. & O'NEILL S. L. (2009)a : A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya and *Plasmodium*. *Cell*, 139(7):1268–1278.
- MOREIRA L. A., SAIG E., TURLEY A. P., RIBEIRO J. C., O'NEILL S. L. & MCGRAW E. A. (2009)b : Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(12):e568.
- MORET Y., JUCHAULT P. & RIGAUD T. (2001) : Endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean : effects in natural and foreign hosts. *Heredity*, 86:325–332.
- MOUTON L. (2005) : *Diversité et densité bactériennes dans les symbioses à infections multiples : régulation et effets sur l'hôte. Cas des associations Wolbachia-insectes.* Thèse de doctorat, Université Lyon I.
- 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(1):181–189.
- MOYA A., PERETÓ J., GIL R. & LATORRE A. (2008) : Learning how to live together : genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet*, 9(3):218–29.
- MULLER F. L., LUSTGARTEN M. S., JANG Y., RICHARDSON A. & REMMEN H. V. (2007) : Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*, 43(4):477–503.

-
- MUYZER G., de WAAL E. C. & UITTERLINDEN A. G. (1993) : Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59(3):695–700.
- MYER J. & ROTHMAN L. (1995) : Virulence and transmission of infectious diseases in humans and insects : evolutionary and demographic patterns. *Trends Ecol Evol*, 10:194–198.
- MÜNCHHOFF J., HIROSE E., MARUYAMA T., SUNAIRI M., BURNS B. P. & NEILAN B. A. (2007) : Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron sp.*, an obligate symbiont in didemnid ascidians. *Environ Microbiol*, 9(4):890–899.
- NARDON P. (1971) : Contribution à l'étude des symbiotes d'ovaires de *Sitpophilus sasakii* : localisation, histochimie et ultrastructure chez la femelle adulte. *C R Acad Sci III*, 272:2975–2978.
- NARITA S., KAGEYAMA D., NOMURA M. & FUKATSU T. (2007) : Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex : feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Appl Environ Microbiol*, 73(13):4332–4341.
- NEALSON K., PLATT T. & HASTINGS J. (1970) : Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, 104:313–322.
- NEGRI I., PELLECCIA M., MAZZOGGIO P. J., PATETTA A. & ALMA A. (2006) : Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proc Biol Sci*, 273(1599):2409–2416.
- NIU H., YAMAGUCHI M. & RIKIHISA Y. (2008) : Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol*, 10(3):593–605.

-
- NYHOLM S. V. & MCFALL-NGAI M. J. (2004) : The winnowing : establishing the squid-*vibrio* symbiosis. *Nat Rev Microbiol*, 2(8):632–642.
- O'NEILL S. L., GIORDANO R., COLBERT A. M., KARR T. L. & ROBERTSON H. M. (1992) : 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7): 2699–2702.
- PAIS R., LOHS C., WU Y., WANG J. & AKSOY S. (2008) : The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Appl Environ Microbiol*, 74(19):5965–5974.
- PENG Y., NIELSEN J. E., CUNNINGHAM J. P. & MCGRAW E. A. (2008) : *Wolbachia* infection alters olfactory-cued locomotion in *Drosophila* spp. *Appl Environ Microbiol*, 74(13):3943–3948.
- PEROTTI M. A., ALLEN J. M., REED D. L. & BRAIG H. R. (2007) : Host-symbiont interactions of the primary endosymbiont of human head and body lice. *FASEB J*, 21(4):1058–1066.
- PICHON S., BOUCHON D., CORDAUX R., CHEN L., GARRETT R. A. & GRÈVE P. (2009) : Conservation of the Type IV Secretion System throughout *Wolbachia* evolution. *Biochem Biophys Res Commun*, 385(4):557–562.
- PINTUREAU B., GRENIER S., BOLÉAT B., LASSABLIÈRE F., HEDDI A. & KHATCHADOURIAN C. (2000) : Dynamics of *Wolbachia* populations in trans-fected lines of *Trichogramma*. *J Invertebr Pathol*, 76(1):20–5.
- PLANTARD O., RASPLUS J., MONDOR G., CLAINCHE I. L. & SOLIGNAC M. (1998) : *Wolbachia*-induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissima* (Giraud) (Hymenoptera : Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host. *Proc Biol Sci*, 265:1075–1080.

-
- POKARZHEVSKII A., van STRAALEN N., ZABOEV D. & ZAITSEV A. (2003) : Microbial links and element flows in nested detrital food-webs. *Pedobiologia*, 47:213–224.
- RAINEY P. (2004) : Bacteria populations adapt - genetically, by natural selection - even in the lab. *Microbiol Today*, 31:160–162.
- RASBAND W. (1997) : ImageJ. Rapport technique, National Institutes of Health Bethesda, Maryland, USA.
- RASGON J. L., GAMSTON C. E. & REN X. (2006) : Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Appl Environ Microbiol*, 72(11):6934–6937.
- RENAUD F. J., GUÉGAN F. & THOMAS F. (2007), *Ecologie et évolution des systèmes parasités* : De Boeck Université.
- REUTER M. & KELLER L. (2003) : High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Mol Biol Evol*, 20:748–753.
- REYNOLDS E. (1963) : The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 17:208–212.
- RIEGLER M., CHARLAT S., STAUFFER C. & MERÇOT H. (2004) : *Wolbachia* Transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans* : Investigating the Outcomes of Host-Symbiont Coevolution. *Appl Environ Microbiol*, 70:273–279.
- RIGAUD T. (1997), *Influential passengers*, chapitre Inherited microorganisms and sex determination of arthropods hosts, pages 81–101 : O'NEILL S., WERREN J. & HOFFMANN A., éditeurs. Oxford University Press.
- RIGAUD T. & JUCHAULT P. (1995) : Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J Evol Biol*, 8:249–255.
- RIGAUD T. & ROUSSET F. (1996) : What generates the diversity of *Wolbachia* - Arthropod interactions ? *Biodiversity and Conservation*, 5:999–1013.

-
- RIGAUD T., SOUTY GROSSET C., RAIMOND R., MOCQUARD J. P. & JUCHAULT P. (1991) : Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda) : Recent acquisitions. *Endocytobiosis Cell Res*, 7:259–273.
- RIGAUD T., MOCQUARD J. & JUCHAULT P. (1992) : The spread of parasitic sex factors in populations of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea) : effects on sex-ratio. *Gen. Sel. Evol.*, 24:3–18.
- RIGAUD T., MOREAU J. & JUCHAULT P. (1999) : *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus* : sex ratio distortion and effect on fecundity. *Heredity*, 83(4):469–75.
- RIGAUD T., PENNINGS P. S. & JUCHAULT P. (2001) : *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. *J Invertebr Pathol*, 77(4):251–7.
- RIKIHISA Y. & LIN M. (2010) : *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Curr Opin Microbiol*, 13(1):59–66.
- ROBIDART J. C., BENCH S. R., FELDMAN R. A., NOVORADOVSKY A., PODELL S. B., GAASTERLAND T., ALLEN E. E. & FELBECK H. (2008) : Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environ Microbiol*, 10(3):727–737.
- ROUSSET F., VAUTRIN D. & SOLIGNAC M. (1992) : Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc Biol Sci*, 247(1320):163–168.
- ROWLEY S. M., RAVEN R. J. & MCGRAW E. A. (2004) : *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol*, 49(3):208–214.
- ROZEN S. & SKALETISKY H. (2000) : Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132:365–386.

-
- RUBY E. G. (1996) : Lessons from a cooperative, bacterial-animal association : the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol*, 50:591–624.
- RUBY E. G. & MCFALL-NGAI M. J. (1999) : Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends Microbiol*, 7(10):414–420.
- SACHS J. L., EHINGER M. O. & SIMMS E. L. (2010) : Origins of cheating and loss of symbiosis in wild Bradyrhizobium. *J Evol Biol*, 23(5):1075–1089.
- SACHS J. L., ESSENBERG C. J. & TURCOTTE M. M. (2011) : New paradigms for the evolution of beneficial infections. *Trends Ecol Evol*, 26(4):202–209.
- SACHS J. L., MUELLER U. G., WILCOX T. P. & BULL J. J. (2004) : The evolution of cooperation. *Q Rev Biol*, 79(2):135–160.
- SARIDAKI A. & BOURTZIS K. (2010) : *Wolbachia* : more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol*, 13(1):67–72.
- SAVAGE D. (1977) : Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*, 31:107–133.
- SCHNEIDER D. S. & AYRES J. S. (2008) : Two ways to survive infection : what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol*, 8(11):889–95.
- SERBUS L. R., CASPER-LINDLEY C., LANDMANN F. & SULLIVAN W. (2008) : The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet*, 42:683–707.
- SICARD M., BRUN N. L., PAGES S., GODELLE B., BOEMARE N. & MOULIA C. (2003) : Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts : contrasting types of interaction. *Parasitol Res*, 91(6):520–524.

-
- SICARD M., CHEVALIER F., de VLECHOUVER M., BOUCHON D., GRÈVE P. & BRAQUART-VARNIER C. (2010) : Variations of immune parameters in terrestrial isopods : a matter of gender, aging and *Wolbachia*. *Naturwissenschaften*, 97(9): 819–826.
- SIMMS E. L., TAYLOR D. L., POVICH J., SHEFFERSON R. P., SACHS J. L., URBINA M. & TAUSCZIK Y. (2006) : An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume-*rhizobium* interaction. *Proc Biol Sci*, 273(1582):77–81.
- SIOZIOS S., SAPOUNTZIS P., P.IOANNIDIS & BOURTZIS K. (2008) : *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insect Science*, 15(1):89–100.
- SITNIKOV D. M., SCHINELLER J. B. & BALDWIN T. O. (1996) : Control of cell division in *Escherichia coli* : regulation of transcription of *ftsQA* involves both *rpoS* and *SdiA*-mediated autoinduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1):336–341.
- SPRENT J., SUTHERLAND J. & FARIA S. D. (1987) : Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *Phil Trans R Soc Lond B*, 317:111–129.
- STEINERT M., HENTSCHEL U. & HACKER J. (2000) : Symbiosis and pathogenesis : evolution of the microbe-host interaction. *Naturwissenschaften*, 87(1):1–11.
- STEWART A. D., LOGSDON J. M. & KELLEY S. E. (2005) : An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution*, 59(4):730–739.
- STOLK C. & STOUTHAMER R. (1996) : Influence of a cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* on the fitness of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Proc Exper & Appl Entomol*, 7:33–37.
- STOUTHAMER R. & KAZMER D. (1994) : Cytogenetic of microbe associated parthenogenesis, consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73:317–327.

-
- STOUTHAMER R., BREEUWER J. A. & HURST G. D. (1999) : *Wolbachia pipientis* : microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*, 53:71–102.
- SUGIMOTO T. N. & ISHIKAWA Y. (2012) : A male-killing *Wolbachia* carries a feminizing factor and is associated with degradation of the sex-determining system of its host. *Biol Lett*, 8(3):412–415.
- SUH E., MERCER D. R., FU Y. & DOBSON S. L. (2009) : Pathogenicity of life-shortening *Wolbachia* in *Aedes albopictus* after transfer from *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol*, 75(24):7783–7788.
- SUTTON S. L., HASSAL M., WILLOWS R., DAVID R. C., GRUND A. & SUNDERLAND K. D. (1984) : Life histories of terrestrial isopods : a study of intra and interspecific variation. *Symp Zool Soc Lond*, 53:269–294.
- TAYLOR M. J., BANDI C. & HOERAUF A. (2005) : *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasitol*, 60:245–284.
- TEIXEIRA L., FERREIRA A. & ASHBURNER M. (2008) : The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 6(12):e2.
- THERNEAU T., GRAMBSCH P. & PANKRATZ V. (2003) : Penalized Survival Models and Frailty. *J Comput Graph Stat*, 12:156–175.
- THORNER A. R., WALKER D. H. & PETRI W. A. (1998) : Rocky mountain spotted fever. *Clin Infect Dis*, 27(6):1353–1360.
- THRALL P. H., HOCHBERG M. E., BURDON J. J. & BEVER J. D. (2007) : Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends Ecol Evol*, 22(3):120–126.

-
- TIMMERMANS M., MARIEN J., ROELOFS D., STRAALEN N. V. & ELLERS J. (2004) : Evidence for multiple origins of *Wolbachia* infection in springtails. *Pedobiologia*, 48:469–475.
- TRENCH R. (1993) : Microalgal-Invertebrate Symbioses - A Review. *Endocytobiosis Cell Res*, 9:135–175.
- TSAGKARAKOU A., GUILLEMAUD T., ROUSSET F. & NAVAJAS M. (1996) : Molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a *Tetranychus urticae* strain (Acari : Tetranychidae). *Insect Mol Biol*, 5(3):217–221.
- TURELLI M. & HOFFMANN A. A. (1995) : Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* : dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, 140(4):1319–1338.
- TURELLI M. (2010) : Cytoplasmic incompatibility in populations with overlapping generations. *Evolution*, 64(1):232–241.
- TURLEY A. P., MOREIRA L. A., O'NEILL S. L. & MCGRAW E. A. (2009) : *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(9):e516.
- VAN MEER M. M. M. & STOUTHAMER R. (1999) : Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera : Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera : Drosophilidae). *Heredity*, 82(2):163–169.
- van VALEN L. (1973) : A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1(1):1–30.
- VAVRE F., FLEURY F., LEPETIT D., FOUILLET P. & BOULÉTREAU M. (1999) : Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol*, 16(12):1711–23.
- VAVRE F., de JONG J. H. & STOUTHAMER R. (2004) : Cytogenetic mechanism and

genetic consequences of thelytoky in the wasp *Trichogramma cacoeciae*. *Heredity*, 93(6):592–596.

VERNE S., JOHNSON M., BOUCHON D. & GRANDJEAN F. (2007) : Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene*, 397(1-2):58–66.

VIGNEUX F., BASHEY F., SICARD M. & LIVELY C. M. (2008) : Low migration decreases interference competition among parasites and increases virulence. *J Evol Biol*, 21(5):1245–1251.

VILJAKAINEN L., REUTER M. & PAMILO P. (2008) : *Wolbachia* transmission dynamics in *Formica* wood ants. *BMC Evol Biol*, 8:55.

VORONIN D., COOK D. A. N., STEVEN A. & TAYLOR M. J. (2012) : Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(25):E1638–E1646.

VRIJENHOEK R. C. (2010), *The Vent and Seep Biota : Aspects from Microbes to Ecosystems*, volume 33 : Springer, Berlin, Germany.

WARBURG M., LINSSENMAIR K. & BERCOVITZ K. (1984) : The effect of climate on the distribution and abundance of Isopods. *Symp Zool Soc Lond*, 53:339–367.

WATANABE M., TAGAMI Y., MIURA K., KAGEYAMA D. & STOUTHAMER R. (2012) : Distribution patterns of *Wolbachia* endosymbionts in the closely related flower bugs of the genus *Orius* : Implications for coevolution and horizontal transfer. *Microb Ecol*, 64(2):537–545.

WEEKS A. R. & BREEUWER J. A. (2001) : *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc Biol Sci*, 268(1482):2245–2251.

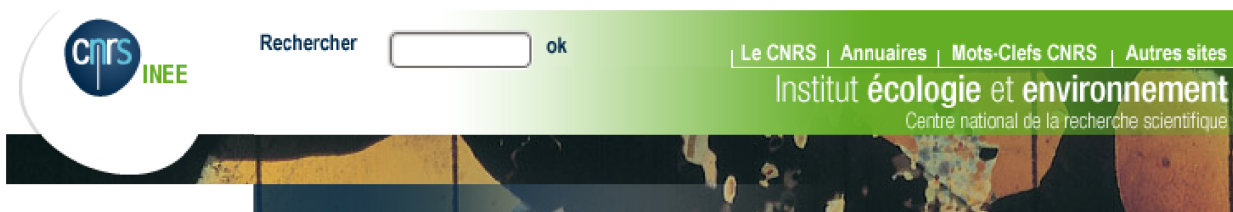
WEEKS A. R., TURELLI M., HARCOTBE W. R., REYNOLDS K. T. & HOFFMANN

-
- A. A. (2007) : From parasite to mutualist : rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol*, 5(5):e114.
- WENSELEERS T., SUNDSTRÖM L. & BILLEN J. (2001) : Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. *Proc Biol Sci*, 269:623–629.
- WERREN J. H. (1997) : Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, 42:587–609.
- WERREN J. H., SKINNER S. & HUGER A. (1986) : Male-killing bacteria in parasitic wasp. *Science*, 231:990–992.
- WERREN J. H., ZHANG W. & GUO L. R. (1995) : Evolution and phylogeny of *Wolbachia* : reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci*, 261(1360):55–63.
- WERREN J. H., BALDO L. & CLARK M. E. (2008) : *Wolbachia* : master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*, 6(10):741–51.
- WEST S. A., COOK J. M., WERREN J. H. & GODFRAY H. C. (1998) : *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol Ecol*, 7(11):1457–1465.
- WILLIAMS K., SOBRAL B. & DICKERMAN A. (2007) : A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol*, 189:4578–4586.
- WON Y. J., JONES W. J. & VRIJENHOEK R. C. (2008) : Absence of cospeciation between deep-sea mytilids and their thiotrophic endosymbionts. *J Shellfish Res*, 27:129–138.
- XI Z., KHOO C. C. H. & DOBSON S. L. (2005) : *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*, 310(5746):326–328.
- XI Z., KHOO C. C. H. & DOBSON S. L. (2006) : Interspecific transfer of *Wolbachia* into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proc Biol Sci*, 273(1592):1317–22.

-
- YATES W. D., JERICHO K. W. & DOIGE C. E. (1983) : Effect of bacterial dose on pneumonia induced by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res*, 44(2):238–243.
- YIP E. S., GESZVAIN K., DELONEY-MARINO C. R. & VISICK K. L. (2006) : The symbiosis regulator *rscS* controls the *syp* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*, 62(6):1586–1600.
- YOURTH C. P. & SCHMID-HEMPEL P. (2006) : Serial passage of the parasite *Crithidia bombi* within a colony of its host, *Bombus terrestris*, reduces success in unrelated hosts. *Proc Biol Sci*, 273(1587):655–659.
- YUN Y., PENG Y., LIU F. X. & LEI C. (2011) : *Wolbachia* screening in spiders and assessment of horizontal transmission between predator and prey. *Neotrop Entomol*, 40(2):164–169.
- ZHUKOVA M. V. & KISELEVA E. (2012) : The virulent *Wolbachia* strain *wMelPop* increases the frequency of apoptosis in the female germline cells of *Drosophila melanogaster*. *BMC Microbiol*, 12 Suppl 1:S15.
- ZUG R., KOEHNCKE A. & HAMMERSTEIN P. (2012) : Epidemiology in evolutionary time : the case of *Wolbachia* horizontal transmission between arthropod host species. *J Evol Biol*, 25.
- ZUG R. & 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(6):e38544.

Huitième partie

Annexes : Lorsque *Wolbachia* et les cloportes colonisent la toile...



Accueil > Espace communication > En direct des laboratoires

En direct des laboratoires

7 septembre 2012

Combattre ou tolérer ? Ou comment on peut mourir de trop se défendre

Dans une étude publiée par *PLoS Pathogens*, une équipe française des laboratoires Écologie et biologie des interactions (CNRS/Université de Poitiers) et Évolution et diversité biologique (CNRS/Université Toulouse III – Paul Sabatier/ENFA) a exploré les stratégies de transmission d'une bactérie parasite. Ce travail a montré qu'en étant implantée chez une autre espèce que son hôte naturel, cette bactérie devenait fatale : le nouvel hôte, à trop se défendre contre un parasite inconnu, provoque sa propre mort !

Rechercher
sur ce site :



Pour se transmettre d'un hôte à l'autre, les parasites ont le choix entre deux stratégies : soit l'option « cool », en diminuant leur virulence pour profiter de la reproduction de l'hôte afin de se transmettre à sa descendance, soit, au contraire, l'option agressive où la virulence est augmentée, ce qui favorise une transmission infectieuse. Les bactéries *Wolbachia* constituent un modèle idéal pour étudier de telles stratégies. Ces bactéries symbiotiques infectent un large spectre d'arthropodes (insectes, araignées, crustacés, etc.) chez qui elles se transmettent par voie verticale, de la mère aux descendants. Dans ce contexte, on observe en général une faible virulence des *Wolbachia*, car celles-ci n'ont pas intérêt à affaiblir leur hôte. Cependant, de nombreux indices suggèrent qu'un autre mode de transmission, par voie horizontale (infectieuse, d'hôte à hôte), joue un rôle important dans la dispersion de ces bactéries. Dans ce cas, on peut s'attendre à ce que leur virulence soit modifiée, en particulier lorsque hôtes et parasites n'ont pas co-évolué.

Dans l'étude publiée par *PLoS Pathogens*, une souche de *Wolbachia*, peu virulente chez son hôte natif, le cloporte commun, a été introduite artificiellement chez une espèce voisine, *Porcellio d. dilatatus*. Ce transfert de parasite aboutit à la mort des receveurs. Des symptômes tels que la perte d'activité locomotrice accompagnée de tremblements et de convulsions suggèrent une atteinte du système nerveux. Les *Wolbachia* se multiplient certes abondamment dans le système nerveux central de l'hôte receveur mais *pas plus* que chez l'hôte natif, lequel ne présente pas ces symptômes. En revanche, il y a une grande différence entre les hôtes natifs et les receveurs : alors que les cellules nerveuses des premiers conservent un aspect normal malgré l'infection, les cellules nerveuses des seconds sont totalement désorganisées suite au processus d'autophagie. Il s'agit d'un moyen de lutte qui consiste, pour la cellule infectée, à digérer une partie de son contenu s'il est indésirable. Ainsi, l'hôte natif chez qui la bactérie se transmet verticalement semble tolérer cette dernière sans déclencher de réponse autophagique tandis qu'à la suite d'un transfert horizontal, l'hôte receveur essaye de lutter. L'intense réaction autophagique déclenchée contre le symbiote se retourne alors contre l'hôte lui-même et semble être la cause des symptômes observés et de la mort qui s'ensuit.

Ces résultats montrent qu'un symbiote peut devenir pathogène du fait de la réaction de défense que son hôte déclenche. Cela illustre également le fait que, dans certaines situations d'infection par un microorganisme, la tolérance immunitaire peut constituer une meilleure stratégie que la lutte...



Un *Porcellio d. dilatatus* paralysé après qu'une souche de *Wolbachia* lui a été transférée
© Winka Le Clec'h

Référence

High Virulence of *Wolbachia* after Host Switching : When Autophagy Hurts, *PLoS Pathogens*, Winka Le Clec'h, Christine Braquart-Varnier, Maryline Raimond, Jean-Baptiste Ferdy, Didier Bouchon & Mathieu Sicard.

Contact chercheur

Mathieu Sicard, unité Ecologie et biologie des interactions (UMR 7267 CNRS / Université de Poitiers), 40 avenue du recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex. Tél. : 05 49 45 39 81. E-mail : mathieu.sicard@univ-poitiers.fr

Contact presse

Florence Royer, Service communication CNRS Délégation Centre Poitou-Charentes
Florence.Royer@dr8.cnrs.fr



M Blogs

Passeur de Sciences

Petites et grandes nouvelles dans l'actualité des sciences et de l'environnement

Le blog de Pierre Barthélémy
journaliste scientifique

9 septembre 2012, par Pierre Barthélémy

Comment on peut mourir de trop se défendre contre une bactérie

Recommander 543



Si vous ne connaissez pas les *Wolbachia*, vous ratez

une petite merveille de la Nature. Enfin... une merveille assez nocive puisque ces bactéries, dont les diverses souches infectent bon nombre d'arthropodes – des insectes aux crustacés en passant par les araignées –, sont des parasites et de grandes manipulatrices. Les scientifiques disent que leur mode de transmission est vertical, c'est-à-dire qu'elles passent d'une génération d'hôtes à la suivante, de la mère à sa descendance, ces bactéries ayant la bonne idée de s'installer pour une bonne partie à l'intérieur des cellules de l'appareil reproducteur. Et tous les coups sont permis afin d'optimiser cette transmission verticale. Exemple parmi plusieurs : comme seuls les arthropodes femelles passent le parasite à leur progéniture *via* leurs ovocytes contaminés, chez le cloporte commun, en photo ci-dessus, *Wolbachia* est capable de... métamorphoser les mâles en femelles.

Il arrive aussi que ces bactéries se transmettent d'un individu à l'autre – on appelle ce cas une transmission horizontale – ou d'une espèce à l'autre. Cette propriété en fait des modèles intéressants pour les chercheurs qui étudient les changements de virulence d'un pathogène lorsqu'il change d'hôte, notamment dans les maladies dites émergentes. Restons avec le cloporte commun : *wVulC*, la souche de *Wolbachia* qui l'infecte, a une virulence assez faible. Si l'on excepte le parasitisme qui affecte ses organes reproducteurs, le crustacé fait plutôt bon ménage avec le micro-organisme. Une équipe française, qui a publié en août ses travaux dans la revue *PLoS Pathogens*, a voulu savoir si cette cohabitation relativement pacifique subsistait lorsqu'on transférait *wVulC* chez un cousin du cloporte commun, une autre espèce de cloporte répondant au doux nom de *Porcellio d. dilatatus*.

Plusieurs semaines après avoir reçu *wVulC* par injection, la population de *P. dilatatus* a commencé à montrer plusieurs symptômes inquiétants : ralentissement du gain de poids, de la mobilité, remontée à la surface du sol, affaiblissement, tremblements dans les pattes, convulsions, paralysie et, enfin, la mort. Au bout de 75 jours, les 30 crustacés infectés avaient succombé. Dans le même temps, aucun de ces symptômes ne se manifestait chez les cloportes communs ayant subi le même traitement (seuls deux individus des groupes témoins sont morts pendant toute l'expérience).

Comment expliquer ce changement de virulence ? Le comportement des arthropodes malades suggérant que le système nerveux central de l'hôte était atteint, les chercheurs sont allés y voir de plus près. Effectivement, les *Wolbachia* y avaient proliféré. Mais pas davantage que chez les cloportes communs ! Ce n'était pas un changement d'activité du parasite qui provoquait une augmentation de la virulence mais... une différence dans la réponse immunitaire du receveur. Pour se défendre contre le micro-organisme, *P. dilatatus* avait en effet employé une défense radicale : l'autophagie, un procédé par lequel la cellule infectée digère une partie de son propre contenu, si le système immunitaire le juge indésirable. Mais là, les cellules nerveuses étaient allées trop loin et se retrouvaient complètement désorganisées alors que chez les cloportes communs, ces cellules, quoique infectées, présentaient un aspect normal.

La conclusion, pour le moins surprenante, de cette jolie étude est qu'à trop se défendre contre une bactérie, on peut mourir. Un comble. La virulence exacerbée de *Wolbachia* chez *P. dilatatus* n'est due qu'à un mauvais choix de stratégie de ce dernier. La bactérie n'est pas devenue subitement pathogène en modifiant son action : elle l'est devenue parce que son hôte s'est fait hara-kiri en voulant la combattre par l'autophagie... L'épée était à double tranchant. A l'inverse, le cloporte commun, hôte "natif" de la souche wVulC, a choisi une stratégie de tolérance vis-à-vis du micro-organisme. Probablement parce qu'il a appris à le connaître au fil de leur co-évolution.

Pierre Barthélémy (@PasseurSciences sur Twitter)

Cette entrée a été publiée dans [Biologie](#), [Evolution](#), avec comme mot(s)-clef(s) [Arthropodes](#), [Autophagie](#), [Bactéries](#), [Cloporte](#), [Défense immunitaire](#), [Maladies émergentes](#), [Mort](#), [Parasitisme](#), [Virulence](#), [Wolbachia](#). Vous pouvez la mettre en favoris avec [ce permalien](#). | [Alerter](#) |

RÉSUMÉ

Les bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* se transmettent verticalement de la mère aux descendants mais également horizontalement d'un hôte arthropode à l'autre. Chez les isopodes terrestres, les *Wolbachia* montrent une diversité et une prévalence élevées et bouleversent la reproduction de leurs hôtes en féminisant les mâles ou en induisant des incompatibilités de croisements. Nous avons utilisé la diversité de ces souches de *Wolbachia* pour étudier leur plasticité en terme de changement d'hôte et l'évolution de leur virulence. Nos résultats montrent la grande plasticité des *Wolbachia*, s'installant chez tous les hôtes testés. Par ailleurs, un transfert horizontal est possible à partir de différentes sources tissulaires : ovaires et hémocytes ainsi que lors de la prédation d'un individu infecté. De plus, les transferts horizontaux aux échelles intra comme interspécifique peuvent modifier la nature des interactions entre *Wolbachia* et leurs hôtes et mener à une relation de type hôte-pathogène. Ce type d'interaction a été spécifiquement exploré pour comprendre les mécanismes impliqués dans les changements de virulence. Nous avons démontré que la réponse autophagique de l'hôte contre *Wolbachia* pouvait jouer un rôle majeur dans la nature pathogène de l'interaction. De plus, par une approche d'évolution expérimentale, nous montrons que *Wolbachia* peut devenir pathogène pour son hôte natif chez qui elle est habituellement peu virulente. En détournant les *Wolbachia* de leur voie de transmission verticale et en les transmettant uniquement de manière horizontale, elles deviennent beaucoup plus invasives et tuent leur hôte.

MOTS-CLÉS

Wolbachia, symbiose, isopodes terrestres, transferts horizontaux, virulence, autophagie, évolution expérimentale, PCRq

ABSTRACT

Wolbachia are basically endosymbiotic bacteria, vertically transmitted from mother to offspring. However, they can also pass horizontally from one arthropod host to another. Among terrestrial isopods, the *Wolbachia* exhibit high diversity and prevalence and disturb their host reproduction by feminizing males into females or inducing crossing incompatibilities. We took advantage of this diversity of *Wolbachia* in terrestrial isopods to study their plasticity through hosts switching and the evolution of their virulence. Our results highlighted their huge plasticity as they were capable of settling in all the tested terrestrial isopods hosts. These horizontal transfers can be performed with different tissues as a source of *Wolbachia* : Ovaries and hemocytes, but also when an uninfected host preyed an infected one. Moreover, horizontal transfers can modify the nature of the interaction between *Wolbachia* and their hosts moving towards a host-pathogen relationship. We further explored such conflicting interactions in order to investigate the reasons of the changes in virulence. We demonstrated that the host autophagic response against *Wolbachia* can turn against the host itself and making the symbiont a pathogen. Moreover, by using experimental evolution, we revealed that *Wolbachia* could increase in virulence against the native host it normally does not harm in a context of vertical transmission. When we disrupted the vertical transmission mode in order to exclusively transmit *Wolbachia* by horizontal contagious mode, they became much more invasive and rapidly killed their native host.

KEYWORDS

Wolbachia, symbiosis, terrestrial isopods, horizontal transfers, virulence, autophagy, experimental evolution, qPCR
